

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los  
Alimentos**



**TESIS DOCTORAL**

**Etiología y epidemiología de las mastitis humanas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Pilar Mediano Pérez**

Directores

**María Marín Martínez  
Leónides Fernández Álvarez  
Juan Miguel Rodríguez Gómez**

**Madrid, 2016**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA  
Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**



**ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LAS  
MASTITIS HUMANAS**

**TESIS DOCTORAL**

**PILAR MEDIANO PÉREZ**

**DIRECTORES**

**MARÍA MARÍN MARTÍNEZ**

**LEÓNIDES FERNÁNDEZ ÁLVAREZ**

**JUAN MIGUEL RODRÍGUEZ GÓMEZ**

**Madrid, 2015**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología  
y Tecnología de los Alimentos



# **ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA DE LAS MASTITIS HUMANAS**

Memoria que para optar al grado de Doctor  
presenta la Licenciada Pilar Mediano Pérez

Madrid, 2015





DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE  
LOS ALIMENTOS  
FACULTAD DE VETERINARIA

---

MARÍA MARÍN MARTÍNEZ, LEÓNIDES FERNÁNDEZ ÁLVAREZ y JUAN MIGUEL RODRÍGUEZ GÓMEZ, Profesoras Titulares y Catedrático del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “*Etiología y epidemiología de las mastitis humanas*”, de la que es autora la Licenciada en Ciencias Biológicas Dña. **Pilar Mediano Pérez**, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor.

Madrid, 4 de octubre de 2015

María Marín Martínez      Leónides Fernández Álvarez      Juan Miguel Rodríguez Gómez



*A mi madre  
y  
a mi marido Antonio*





“Nunca consideres el estudio  
como una obligación, sino  
como una oportunidad para  
penetrar en el bello y  
maravilloso mundo del saber”

*Albert Einstein*

“Debemos usar el tiempo  
sabiamente y darnos cuenta  
de que siempre es el  
momento oportuno para hacer  
las cosas bien”

*Nelson Rolihlahla Mandela*



*Tengo mucho que agradecer a muchas personas, sin las cuales no habría podido realizar este sueño de conseguir llevar a cabo esta Tesis Doctoral, y, en primer lugar quiero hacerlo a la Profesora María Marín, sin cuya dedicación no hubiera conseguido terminar esta empresa. María, gracias por estar pendiente de mí. Por supuesto tengo que agradecer al profesor Juan Miguel Rodríguez el que me acogiera en el departamento sin importarle mi situación personal. Él es la persona más inteligente que conozco y que sabe mantener el equipo de trabajo con humor y buen hacer profesional. Y a la profesora Leónides Fernández, incansable trabajadora. No os voy a olvidar fácilmente.*

*El trabajo realizado en el laboratorio me ha enriquecido a nivel de conocimientos y de relaciones humanas y no hubiera sido posible sin todas mis compañeras que me han ayudado y animado. Rebeca, te debo mucho, tú me introdujiste en el mundo de los microorganismos y sus colonias y me enseñaste muchísimo de técnicas de laboratorio, además mi estancia no hubiera sido lo mismo sin tu risa y tu buen hacer. Virginia, has sido otro pilar superimportante y quiero agradecerte tu apoyo, tu ayuda y tus consejos. Nivia, gracias por estar allí todos los días. Y al resto del equipo que de muchas maneras ha contribuido a mi formación investigadora: Marta, Esther, Irene, Laura, Arancha, Ana. Por supuesto a todos los alumnos de prácticas que han pasado por el laboratorio, gracias por vuestra dedicación y trabajo incansable y lo feliz que me sentí cuando empecé a enseñaros algo.*

*A todos los profesores del departamento en especial a Lola, Charo, Pablo, Teresa, Carmen, Luis y todos los demás por aceptarme y por vuestra amabilidad. A todos los compañeros del departamento y por supuesto a Alberto y Aurora por su ayuda incondicional en cualquier momento. Y quiero dedicarle un recuerdo especial a Odón Sobrino que me puso en contacto con Juan Miguel, por lo que a él le debo todo esto. ¡Ah...! y los bombones que nos llevabas cuando ibas al laboratorio estaban buenísimos.*

*Gracias a Ricardo García del departamento de Informática de la UCM (Universidad Complutense de Madrid) por su colaboración en el análisis estadístico de los datos y su ayuda en el manejo de los programas informáticos, a Tomas García del CIAL (Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación) y a Rosa del Campo del hospital Ramón y Cajal de Madrid. Rosa siempre era un placer ir a verte.*

*Mi más sincero agradecimiento a Aurora y Alberto por su amabilidad siempre que les he pedido alguna gestión. Igualmente me gustaría*

*agradecer la participación de todas las mujeres que amablemente nos han rellenado la encuesta para formar parte de nuestro estudio.*

*Pero sobretodo, quiero agradecer la paciencia, el apoyo que he tenido de mi familia y es a ellos a los que les dedico esta Tesis Doctoral. A mi madre, a la que le he robado mucho tiempo y que siempre me pregunta para que me va a servir esto. A mi padre, en el que pienso todos los días a pesar de que me falta ya hace muchos años, pero sé que se sentiría muy orgulloso. A mis hermanas y sobrinos y por supuesto a mi marido que me ha animado a continuar en momentos de duda y me ha apoyado siempre. He tenido mucha suerte de conocerte.*

*A todos mis amigos y familiares espero recompensaros con creces este tiempo que no os he dedicado.*

*Un beso para mi sobrina Marta Fernández que me ha hecho el diseño de la portada.*

*Sí me he olvidado a alguien ruego que me perdone y aunque no esté mencionado en estas páginas lo llevo en el corazón.*

*Muchas gracias a todos otra vez.*

## *Índice*

---



<b>RESUMEN/SUMMARY</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I. EXPOSICIÓN DEL PROBLEMA A INVESTIGAR</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
<b>II.1. LA LACTANCIA MATERNA</b>	<b>17</b>
II.1.1. BREVE ANATOMÍA DE LA MAMA	17
II.1.2. ESTRUCTURA DE LA GLÁNDULA MAMARIA	18
II.1.3. HISTOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA	20
II.1.4. DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA	22
II.1.4.1. Periodo embrionario	22
II.1.4.2. Del nacimiento a la pubertad	23
II.1.4.3. Pubertad	24
II.1.4.4. Embarazo	25
II.1.4.5. Lactancia	26
II.1.4.6. Etapas posteriores a la lactancia	28
II.1.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA BÁSICA DE LA LECHE	28
II.1.6. BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LA LECHE	31
II.1.7. REGULACIÓN DE LA LACTANCIA	35
II.1.8. ASPECTOS SOCIO-CULTURALES DE LA LACTANCIA	39
II.1.9. BENEFICIOS ASOCIADOS A LA LACTANCIA MATERNA	42
II.1.9.1. Beneficios para el lactante	43
II.1.9.1.1. Aspectos nutritivos	43
II.1.9.1.2. Protección frente a infecciones	45
II.1.9.1.3. Protección frente a otras enfermedades	49
II.1.9.1.4. Beneficios cognitivos	51
II.1.9.2. Beneficios para la madre	51
II.1.9.3. Contraindicaciones médicas para la lactancia	53
<b>II.2. MICROBIOTA DE LA LECHE HUMANA</b>	<b>55</b>
II.2.1. COMPOSICIÓN BACTERIOLÓGICA DE LA LECHE HUMANA	55
II.2.2. FACTORES QUE MODIFICAN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA DE LA LECHE HUMANA	57
II.2.3. ORIGEN DE LAS BACTERIAS PRESENTES EN LA LECHE HUMANA	61
II.2.4. FUNCIONES DE LA MICROBIOTA DE LA LECHE MATERNA	62
<b>II.3. MASTITIS INFECCIOSAS DURANTE LA LACTANCIA</b>	<b>65</b>
II.3.1. CONCEPTO DE MASTITIS	66
II.3.2. MASTITIS: ETIOLOGÍA, PATOGENIA Y SINTOMATOLOGÍA	68
II.3.2.1. Mastitis clínicas	68
II.3.2.1.1. Mastitis agudas	68
II.3.2.1.2. Mastitis subagudas	69
II.3.2.1.3. Mastitis granulomatosas	70
II.3.2.2. Mastitis subclínicas	72
II.3.2.3. Abscesos	72



II.3.3. AGENTES ETIOLÓGICOS CAUSANTES DE MASTITIS INFECCIOSAS .....	74
II.3.3.1. El género <i>Staphylococcus</i> y otros relacionados ( <i>Rothia</i> , <i>Kocuria</i> ).....	74
II.3.3.2. El género <i>Streptococcus</i> .....	76
II.3.3.3. El género <i>Corynebacterium</i> .....	77
II.3.3.4. Otros microorganismos .....	78
II.3.4. DIAGNÓSTICO DE LAS MASTITIS.....	79
II.3.4.1. Diagnóstico clínico. ....	80
II.3.4.2. Diagnóstico de laboratorio .....	80
II.3.4.3. Diagnóstico microbiológico: indicación de realización .....	82
II.3.4.4. Protocolo para el diagnóstico microbiológico de las mastitis.....	83
II.3.4.4.1. Recogida, transporte y conservación de las muestras.....	84
II.3.4.4.2. Recepción de las muestras.....	87
II.3.4.4.3. Procesamiento de las muestras.....	88
II.3.4.4.3.1. Medios de cultivo e inoculación .....	88
II.3.4.4.3.2. Condiciones de incubación de los cultivos .....	89
II.3.4.4.3.3. Lectura de los cultivos.....	89
II.3.4.4.4. Métodos de identificación microbiana .....	89
II.3.4.4.4.1. Métodos fenotípicos .....	90
II.3.4.4.4.2. Métodos moleculares .....	91
II.3.4.4.4.3. Técnicas -ómicas.....	92
II.3.4.4.5. Estudio de la sensibilidad a los antibióticos.....	94
II.3.4.4.4. Criterios para la interpretación e informe de resultados .....	94
II.3.4.5. Diagnóstico diferencial .....	95
II.3.4.5.1. Síndrome de Raynaud .....	96
II.3.4.5.2. Galactocele .....	96
II.3.4.5.3. Fibroadenoma.....	97
II.3.4.5.4. Carcinoma de mama.....	97
II.3.4.5.5. Lesiones de los pezones y areola mamaria .....	97
II.3.5. TRATAMIENTO DE LAS MASTITIS: RELACIÓN CON LA SINTOMATOLOGÍA Y LOS AGENTES ETIOLÓGICOS .....	98
II.3.5.1. Tratamiento de las mastitis agudas .....	98
II.3.5.2. Tratamiento de las mastitis subagudas y subclínicas .....	100
II.3.5.3. Tratamiento de las mastitis granulomatosas.....	103
II.3.5.4. Tratamiento de los abscesos .....	104
II.3.5.5. El fracaso de los antibióticos en el tratamiento de las mastitis.....	104
II.3.5.6. Antiinflamatorios no esteroideos.....	107
II.3.5.7. Prácticas no recomendables durante la mastitis .....	107
<b>II.4. FACTORES DE RIESGO Y FACTORES PROTECTORES DE LA MASTITIS INFECCIOSA .....</b>	<b>109</b>
II.4.1. FACTORES DE RIESGO.....	109
II.4.1.1. Factores del sistema inmunitario del hospedador .....	109
II.4.1.2. Factores de las bacterias implicadas en la mastitis.....	111
II.4.1.3. Factores relacionados con la historia médica de la madre previa al embarazo .....	115
II.4.1.4. Factores relacionados con el embarazo, el parto y el posparto .....	117
II.4.1.5. Factores relacionados con lactancia .....	121

## II.4.2. FACTORES PROTECTORES.

II.4.2.1. Factores relacionados con la composición de la leche materna.....	124
II.4.2.2. Factores relacionados con la microbiota de la leche materna .....	126
II.4.2.3. Factores relacionados con la lactancia .....	127
II.4.2.4. Estrategias para la prevención de las mastitis lactacionales basadas en la modulación de la microbiota mamaria .....	127

**CAPÍTULO III****129**

**DIVERSIDAD MICROBIANA EN LA LECHE DE MUJERES CON MASTITIS: PAPEL  
POTENCIAL DE LOS ESTAFILOCOCOS COAGULASA-NEGATIVOS, STREPTOCOCOS  
DEL GRUPO VIRIDIANS Y CORINEBACTERIAS**

***MICROBIAL DIVERSITY IN MILK OF WOMEN WITH MASTITIS: POTENTIAL ROLE  
OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI, GROUP VIRIDANS STREPTOCOCCI  
AND CORYNEBACTERIA***

<b>III.1. ABSTRACT .....</b>	<b>131</b>
<b>III.2. INTRODUCTION .....</b>	<b>132</b>
<b>III.3. METHODS .....</b>	<b>134</b>
III.3.1. Milk samples .....	134
III.3.2. Isolation and identification of culturable bacteria .....	134
III.3.3. Statistical analysis .....	136
<b>III.4. RESULTS.....</b>	<b>137</b>
III.4.1. Microbiological characterization of milk samples from women with mastitis	137
III.4.2. Identification of isolates from lactational mastitis based on the sequencing of 16S rRNA gene.....	138
III.4.3. Bacterial diversity in milk samples from women with mastitis .....	139
<b>III.5. DISCUSSION .....</b>	<b>141</b>
<b>III.6. CONCLUSION .....</b>	<b>149</b>
<b>III.7. REFERENCES .....</b>	<b>150</b>

**CAPÍTULO IV****165**

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE LOS ESTREPTOCOCOS AISLADOS DE LECHE  
HUMANA Y COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS PARA SU  
IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA**

***STREPTOCOCCAL DIVERSITY OF HUMAN MILK AND COMPARISON OF  
DIFFERENT METHODS FOR THE TAXONOMIC IDENTIFICATION OF  
STREPTOCOCCI***

<b>IV.1. ABSTRACT .....</b>	<b>167</b>
<b>IV.2. BACKGROUND.....</b>	<b>168</b>
<b>IV.3. METHODS.....</b>	<b>168</b>
IV.3.1. Bacterial isolates.....	168
IV.3.2. Identification based on the sequencing of housekeeping genes (16S rRNA, tuf, and sodA) .....	168
IV.3.3. Phylogenetic analysis.....	169
IV.3.4. Identifications by MALDI-TOF mass spectrometry.....	169

<b>IV.4. RESULTS</b> .....	170
IV.4.1. Identification based on the sequencing of housekeeping genes .....	170
IV.4.2. Identification based on phylogenetic analysis.....	170
IV.4.3. Identifications by MALDI-TOF mass spectrometry .....	171
<b>IV.5. DISCUSSION</b> .....	172
<b>IV.6. CONCLUSION</b> .....	175
<b>IV.7. REFERENCES</b> .....	175
<b>SUPPLEMENTARY TABLE</b> .....	178

---

<b>CAPÍTULO V</b>	<b>185</b>
-------------------	------------

---

**CASE-CONTROL STUDY OF RISK FACTORS FOR INFECTIOUS MASTITIS IN SPANISH BREASTFEEDING WOMEN**

<b>V.1. ABSTRACT</b> .....	187
<b>V.2. BACKGROUND</b> .....	187
<b>V.3. METHODS</b> .....	188
V.3.1. Subject selection .....	188
V.3.2. Statistical analysis .....	188
<b>V.4. RESULTS</b> .....	190
<b>V.5. DISCUSSION</b> .....	197
<b>V.6. CONCLUSIONS</b> .....	199
<b>V.7. REFERENCES</b> .....	199

**FACTORES DE RIESGO DE LA MASTITIS INFECCIOSA EN MUJERES LACTANTES: ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES EN POBLACIÓN ESPAÑOLA (PARTE 1)**

<b>V.1. RESUMEN</b> .....	201
<b>V.2. INTRODUCCIÓN</b> .....	202
<b>V.3. MÉTODOS</b> .....	202
V.3.1. Selección de casos y controles .....	202
V.3.2. Análisis estadístico .....	203
<b>V.4. RESULTADOS</b> .....	203
<b>V.5. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	205

**FACTORES DE RIESGO DE LA MASTITIS INFECCIOSA EN MUJERES LACTANTES: ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES EN POBLACIÓN ESPAÑOLA (PARTE 2)**

<b>V.1. RESUMEN</b> .....	213
<b>V.2. DISCUSIÓN</b> .....	214
<b>V.3. CONCLUSIONES</b> .....	216
<b>V.4. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	217

**CAPÍTULO VI****219****FACTORES DE RIESGO DE LA MASTITIS INFECCIOSA LACTACIONAL: ÁRBOL DE DECISIÓN VERSUS ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA****RISK FACTORS PREDICTING INFECTIOUS LACTATIONAL MASTITIS: DECISION TREE APPROACH VERSUS LOGISTIC REGRESSION ANALYSIS**

<b>VI.1. ABSTRACT</b> .....	221
<b>VI.2. INTRODUCTION</b> .....	222
<b>VI.3. METHODS</b> .....	224
VI.3.1. <i>Participants</i> .....	224
VI.3.2. <i>Questionnaire</i> .....	224
VI.3.2. <i>Statistical analysis</i> .....	224
VI.3.4. <i>Comparison between LR and DT models</i> .....	225
<b>VI.4. RESULTS</b> .....	227
VI.4.1. <i>CHAID Decision Tree</i> .....	227
VI.4.2. <i>Comparison between LR and DT models</i> .....	228
<b>VI.5. DISCUSSION</b> .....	230
<b>VI.6. REFERENCES</b> .....	234

**CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN GENERAL****243****VII.1. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LECHE DE MUJERES CON MASTITIS** .....

245

VII.1.1. IMPORTANCIA DE LOS CULTIVOS DE LECHE HUMANA PARA EL DIAGNÓSTICO DE MASTITIS .....	245
VII.1.2. <i>STAPHYLOCOCCUS</i> Y OTROS GÉNEROS RELACIONADOS .....	246
VII.1.3. <i>STREPTOCOCCUS</i> .....	248
VII.1.4. <i>CORINEBACTERIAS</i> .....	249
VII.1.5. OTROS MICROORGANISMOS .....	250
VII.1.6. ESTUDIOS METAGENÓMICOS .....	252
VII.1.7. POSIBLES RELACIONES ENTRE LOS MIEMBROS DE LA MICROBIOTA DE LA LECHE .....	253

**VII.2. IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCOS AISLADOS DE LECHE HUMANA** .....

254

VII.2.1. DIFICULTADES EN LA IDENTIFICACIÓN DE LOS ESTREPTOCOCOS....	254
VII.2.2. EMPLEO DE TÉCNICAS MOLECULARES .....	255
VII.2.3. EMPLEO DE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS .....	256

**VII.3. FACTORES DE RIESGO DE LA MASTITIS INFECCIOSA EN MUJERES LACTANTES: ESTUDIO CASO-CONTROL EN POBLACIÓN ESPAÑOLA** .....

258

VII.3.1. FACTORES DE RIESGO DE LA MASTITIS INFECCIOSA EN MUJERES LACTANTES (I). ANÁLISIS BIVARIANTE Y MODELO MULTIVARIANTE DE REGRESIÓN LOGÍSTICA .....	260
VII.3.1.1. Factores relacionados con la historia clínica de la madre .....	260
VII.3.1.2. Factores relacionados con el embarazo, el parto y el posparto .....	262
VII.3.1.3. Factores relacionados con la lactancia .....	262

VII.3.2. FACTORES DE RIESGO DE LA MASTITIS INFECCIOSA EN MUJERES LACTANTES (II). COMPARACIÓN ENTRE MODELOS MULTIVARIANTES: ÁRBOL DE DECISIÓN <i>VERSUS</i> REGRESIÓN LOGÍSTICA.....	267
VII.3.2.1. Análisis de los grupos de mayor riesgo de sufrir mastitis infecciosa según el árbol de decisión .....	270
VII.3.3. FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO .....	272
<b><i>CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES</i></b>	<b>275</b>
<b><i>CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA</i></b>	<b>279</b>
<b><i>CAPÍTULO X. APÉNDICES</i></b>	<b>317</b>
<b><i>APÉNDICE 1</i></b> .....	<b>319</b>
DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DE LAS MASTITIS INFECCIOSAS: PROPUESTA DE PROTOCOLO PARA EL CULTIVO DE MUESTRAS DE LECHE HUMANA .....	329
<b><i>APÉNDICE 2</i></b> .....	<b>325</b>
LACTANCIA MATERNA Y MASTITIS. TRATAMIENTO EMPÍRICO BASADO EN LA SINTOMATOLOGÍA Y LOS AGENTES ETIOLÓGICOS .....	327
<b><i>APÉNDICE 3</i></b> .....	<b>335</b>
CUESTIONARIO EPIDEMIOLÓGICO DEL ESTUDIO SOBRE LOS FACTORES DE RIESGO DE LA MASTITIS INFECCIOSA DURANTE LA LACTANCIA .....	337
<b><i>APÉNDICE 4</i></b> .....	<b>345</b>
LISTADO DE FIGURAS.....	347
LISTADO DE TABLAS.....	348
LISTADO DE ABREVIATURAS .....	349

---

*Resumen*

---

*Summary*



## RESUMEN

La mastitis infecciosa es una patología común durante la lactancia y constituye una de las primeras causas de destete precoz. Por tanto, debería ser considerada un problema de Salud Pública relevante, ya que priva a la pareja madre-hijo de los incuestionables beneficios que la lactancia proporciona. No obstante, la mastitis humana ha sido hasta la fecha una enfermedad subestimada e infradiagnosticada, ya que habitualmente sólo se consideran mastitis los casos agudos que cursan con una sintomatología evidente y su diagnóstico microbiológico no se realiza de forma rutinaria.

La etiopatogenia de la mastitis se ha relacionado con un proceso de disbiosis en la glándula mamaria, que da lugar al sobrecrecimiento de ciertas especies presentes en la leche humana. Sin embargo, la ausencia de un diagnóstico microbiológico rutinario de la leche humana hace que los estudios microbiológicos sobre esta patología sean muy escasos y que se desconozca el papel que juegan muchos agentes etiológicos.

En este trabajo, el análisis microbiológico de 1.849 muestras de leche materna procedentes de mujeres con mastitis ha revelado que el género *Staphylococcus* constituye el primer grupo microbiano implicado en esta patología, siendo *Staphylococcus epidermidis* la especie aislada con mayor frecuencia (91,56% de las muestras). La especie *Staphylococcus aureus* se detectó en el 29,74% de los casos. Los géneros *Streptococcus* y *Corynebacterium* constituyeron, respectivamente, el segundo (70,20%) y tercer (16,60%) grupo microbiano con mayor prevalencia en este estudio. Estos resultados ponen de manifiesto que los estafilococos coagulasa-negativos, los estreptococos del grupo *viridans* y las corinebacterias, habitualmente considerados microorganismos comensales y subestimados como causa de mastitis humanas, tienen un papel relevante como agentes etiológicos de esta patología. Este hecho avala que el análisis microbiológico de la leche, identificando los agentes causales a nivel de especie, es el único medio posible para obtener un diagnóstico etiológico preciso y establecer un tratamiento eficaz para la mastitis.

La relevancia clínica de los estreptococos del grupo *viridans*, en el que se incluyen la mayoría de los estreptococos aislados de la leche humana, resulta especialmente difícil de estimar debido a que la identificación de algunas especies sigue siendo extremadamente complicada. Además, esta dificultad para identificar a los aislados de este grupo causa una notable confusión entre los microbiólogos clínicos y los taxonomistas. En este sentido, para proporcionar un mayor conocimiento sobre la patogenicidad de los estreptococos del grupo *viridans*, así como su creciente resistencia a antibióticos, es necesario realizar una identificación precisa a nivel de especie.

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto que *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, y *Streptococcus parasanguinis* constituyen las especies predominantes de estreptococos en la microbiota de la leche humana. Todas las técnicas



utilizadas, tanto el análisis de las secuencias de los genes 16S rRNA, *tuf*, y *sodA* y del árbol filogenético construido a partir de dichas secuencias concatenadas, como la espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*), permitieron identificar sin dificultad los aislados de estreptococos de leche humana que pertenecían a la especie *St. parasanguinis*, así como a otras especies de los grupos salivarius y mutans. No obstante, el poder de discriminación de estas técnicas no fue suficiente para la identificación de ciertas especies estrechamente relacionadas dentro del grupo mitis, en particular, *St. mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae* y *Streptococcus oralis*, por lo que la caracterización taxonómica precisa de estas especies todavía constituye un reto.

Algunos estudios epidemiológicos han investigado los factores de riesgo potenciales que podrían estar implicados en el desarrollo de la mastitis infecciosa, si bien la mayoría fueron realizados hace más de una década. Por otra parte, en España se carece de datos epidemiológicos acerca de esta patología.

En este contexto, este trabajo constituye el primer estudio epidemiológico sobre factores de riesgo implicados en la mastitis infecciosa realizado en España con una elevada muestra de mujeres lactantes. Para llevarlo a cabo, se diseñó un estudio caso-control, con 368 casos (mujeres con mastitis) y 148 controles. La información se recogió de forma retrospectiva mediante encuestas que recopilaron datos sobre diversos aspectos del historial médico de la madre y del hijo, así como distintos factores relacionados con el embarazo, el parto, el posparto y la lactancia que pudieran estar implicados en el desarrollo de la mastitis. La asociación entre la mastitis y dichas variables se realizó en primer lugar mediante un análisis bivariante y, posteriormente, utilizando dos modelos estadísticos multivariantes (regresión logística *stepwise* y árbol de decisión). Asimismo, se comparó la capacidad para predecir la mastitis de los dos modelos multivariantes.

Los modelos multivariantes utilizados en este trabajo constituyen técnicas estadísticas útiles y complementarias que permiten identificar aquellas variables de predican el riesgo de mastitis en la población general de madres lactantes, así como en pequeños grupos que presentan una combinación de factores que incrementa dicho riesgo (subpoblación de alto riesgo). Entre las variables estudiadas, los dos modelos estadísticos multivariantes utilizados (regresión logística *stepwise* y árbol de decisión) seleccionaron como factores relevantes asociados al riesgo de padecer mastitis los siguientes: antecedentes familiares de mastitis, infecciones de garganta, presencia de grietas en los pezones, uso inadecuado de bombas de extracción, tratamiento con antibióticos orales y antifúngicos tópicos durante la lactancia, así como la edad del niño. La subida de la leche después de 24 h posparto, la separación madre-hijo tras el parto durante más de 24 h, la aplicación de pomadas en los pezones y el padecimiento de mastitis en lactancias previas fueron las variables seleccionadas solamente por el modelo de regresión logística *stepwise*. El uso de biberones y la cantidad de leche

fueron factores de riesgo significativos para ciertos grupos según el modelo basado en el árbol de decisión.

La capacidad para predecir el riesgo de mastitis teniendo en cuenta el parámetro área bajo la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) fue similar en ambos modelos. No obstante, el modelo de regresión logística *stepwise* presentó una mayor exactitud y sensibilidad que el árbol de decisión en el punto de corte óptimo de la curva (índice de Youden) y, este último, una mayor especificidad.

El conocimiento adquirido en este trabajo sobre los factores de riesgo de la mastitis infecciosa permitirá proporcionar un asesoramiento adecuado durante la lactancia, así como diseñar estrategias para prevenir esta enfermedad, con el objetivo final de que muchas parejas madre-hijo disfruten plenamente de los beneficios que proporciona la lactancia materna.



## SUMMARY

Infectious mastitis is a common condition during lactation and constitutes one of the main causes of undesired weaning. This condition should be considered as a relevant Public Health issue, since it deprives the mother-infant pair from the wide range of health benefits that breastfeeding provides. Nevertheless, human mastitis remains to date widely underestimated because human milk cultures are not routinely performed and only acute mastitis cases with local and systemic symptoms are usually reported.

It has been addressed that human mastitis is characterized by a dysbiosis process in the mammary gland, leading to an overgrowth of certain bacterial species present in human milk. However, the etiology of this condition has been scarcely investigated, and the role of some bacterial pathogens remains unclear.

In this study, the microbiological analysis of 1,849 milk samples obtained from women with infectious mastitis has revealed that genus *Staphylococcus* was the most frequently isolated bacterial group. *Staphylococcus epidermidis* was the most common species (91.56% of the samples) while *Staphylococcus aureus* was detected in 29.74% of them. Streptococci and corynebacteria constituted the second (70.20%) and third (16.60%) most prevalent bacterial groups, respectively, in this study. These results show that coagulase-negative staphylococci, viridans group streptococci (VGS) and corynebacteria, usually dismissed as contaminant bacteria, may play an important role as etiological agents of mastitis. Therefore, microbiological analysis of human milk, identifying the disease-causing pathogens at the species level, should be the only method for determining the etiology of mastitis and establishing an efficient treatment of this condition.

The clinical relevance of VGS, which includes most streptococcal species isolated from human milk, is actually difficult to estimate since the identification of some species is still problematic, causing considerable confusion for both clinical microbiologists and taxonomists. In this sense, a precise identification of VGS is becoming an important issue to provide a better understanding of the pathogenicity and antibiotic resistance of each particular species.

The results of this study revealed that *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* and *Streptococcus parasanguinis* constitute the streptococcal dominant species in the human milk microbiota. The techniques used in this work, including sequencing of 16S rRNA, *tuf* and *sodA* genes, phylogenetic analysis and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry, have allowed to identify the isolates belonging to *St. parasanguinis* and other streptococcal species within the salivarius and mutans groups; however, this methodology failed in the identification of closely-related species belonging to the mitis group, particularly *St. mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae* and

*Streptococcus oralis*. These results show that the proper taxonomical identification of some streptococcal species of the mitis group still remains a challenge.

Several epidemiologic studies have been carried out to investigate the potential risk factors that could be involved in human lactational mastitis, but most of them were conducted more than a decade ago and there are not any epidemiological data available about this condition in Spain.

In this context, the present work constitutes the first large epidemiological study about risk factors for infectious mastitis among breastfeeding women in a Spanish population. For this purpose, we conducted a case-control study with 368 cases (women with mastitis) and 148 controls. Data were collected by a questionnaire designed to obtain retrospective information about several factors related to medical history of mother and infant, different aspects of pregnancy, delivery and postpartum, and breastfeeding practices that could be involved in mastitis. A bivariate analysis and two multivariate statistical models (stepwise logistic regression and decision tree) were used to examine the relationship between mastitis and these factors. Additionally, the performance of the logistic regression and decision tree models for predicting this condition was also compared.

The multivariate models used in this work constituted useful and complementary analytical tools to assess the risk of lactational infectious mastitis. The use of both analyses allows us to identify those variables that predict mastitis risk for small subgroups (high-risk subpopulations) as well as for the overall population of breastfeeding mothers. The variables significantly- and independently-associated with mastitis in both multivariate models were history of mastitis in the family, throat infection, cracked nipples, inappropriate use of breast pumps, oral antibiotics and topical antifungal medication during breastfeeding, and infant age. The risk factors only selected by the logistic regression model were breast milk coming in later than 24 h postpartum, mother-infant separation longer than 24 h, ointment on nipples and mastitis in previous lactation periods. Bottle-feeding and milk supply were related to mastitis for certain subgroups in the decision tree model.

The performance to predict the mastitis risk calculated by using the area under the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was similar for logistic regression and decision tree models. Nevertheless, the logistic regression model showed better classification accuracy and sensitivity than the decision tree model while the last one presented better specificity at the optimal threshold of each curve (Youden's Index).

The knowledge acquired in this work about risk factors for infectious mastitis will allow practitioners to provide appropriate management during breastfeeding and develop strategies to prevent this condition, so that many child-mother pairs fully enjoy the benefits of breastfeeding.

*I. Exposición general del problema a  
investigar*

---



La mastitis infecciosa es una patología común durante la lactancia y constituye una de las primeras causas de destete precoz (WHO, 2000; Foxman *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2008). Por tanto, esta enfermedad debería ser considerada un problema de Salud Pública relevante, ya que priva a la pareja madre-hijo de los incuestionables beneficios para la salud que la lactancia proporciona (Ip *et al.*, 2009; U.S. Department of Health and Human Services, 2011; Eidelman *et al.*, 2012; Geddes y Prescott, 2013).

Hasta la fecha, la mastitis humana ha sido un problema subestimado e infradiagnosticado (Delgado *et al.*, 2009a; Jiménez *et al.*, 2009), hecho que se debe, por una parte, a que únicamente se suelen considerar como tales los casos agudos que cursan con una sintomatología evidente. Asimismo, la falta de tradición en el análisis de la leche humana como medio para el diagnóstico de las mastitis ha determinado la ausencia de protocolos estandarizados para la recolección de este tipo de muestras y de criterios para la interpretación de los resultados. En cualquier caso, ante la ausencia de un diagnóstico etiológico y la frecuente prescripción de un tratamiento inadecuado debido al desconocimiento acerca de este problema entre la comunidad médica (Amir y Ingram, 2008; Scott *et al.*, 2008; Eisenberg *et al.*, 2015), las mujeres con esta patología suelen enfrentarse al dilema de seguir amamantando a su hijo aguantando el dolor o abandonar de forma precoz e innecesaria la lactancia.

Estudios recientes han relacionado la etiopatogenia de la mastitis con un proceso de disbiosis o desequilibrio de la diversidad bacteriana en la glándula mamaria, que da lugar al sobrecrecimiento de los agentes etiológicos implicados en la mastitis, acompañado de la disminución de otras especies presentes de manera fisiológica en la leche humana y de la pérdida de biodiversidad (Delgado *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009a; Contreras y Rodríguez, 2011; Fernández *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de los avances en el conocimiento de la etiopatogenia de esta enfermedad, el diagnóstico etiológico se realiza en raras ocasiones y, en consecuencia, los estudios microbiológicos sobre la mastitis infecciosa son muy escasos. De hecho, se desconoce el papel que juegan muchos agentes etiológicos, hecho particularmente evidente en el caso de los estafilococos coagulasa-negativos, estreptococos del grupo *viridans* y corinebacterias, cuya relevancia clínica como causa de mastitis humana está aún por determinar. En el caso de los estreptococos del grupo *viridans*, en el que se incluyen la mayoría de los estreptococos que se aíslan de la leche humana, resulta además especialmente difícil estimar dicha relevancia debido a que la identificación de algunas especies sigue siendo extremadamente complicada, lo que causa una notable confusión entre los microbiólogos clínicos y los taxonomistas (Facklam, 2002; Doern y Burnham, 2010; Ikryannikova *et al.*, 2011; Teles *et al.*, 2011). En este sentido, sería necesaria una identificación precisa dentro de este grupo bacteriano, para alcanzar un mayor conocimiento de la patogenicidad y la resistencia a antibióticos de cada una de las especies que lo componen (Bruckner y Gigliotti, 2006; Doern y Burnham, 2010). Los métodos basados en las técnicas moleculares constituyen una buena alternativa a las pruebas convencionales fenotípicas y bioquímicas para la identificación de especies de



estreptococos del grupo *viridans* (Teles *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2012). No obstante, la secuenciación del gen 16S rRNA, ampliamente aceptada como método para la identificación de especies bacterianas, no es adecuada para discriminar algunas especies de este grupo (Kawamura *et al.*, 1995; Arbique *et al.*, 2004). Además, los frecuentes fenómenos de intercambio genético entre los estreptococos del grupo *viridans* invalidan la identificación basada en el análisis de la secuencia de un único gen (Hakenbeck *et al.*, 2001; Chi *et al.*, 2007; Kilian *et al.*, 2008). Por ello, se han propuesto distintas alternativas como el análisis de las secuencias de distintos genes constitutivos (Poyart *et al.*, 1998; Drancourt *et al.*, 2004; Picard *et al.*, 2004), la construcción de árboles filogenéticos a partir de dichas secuencias concatenadas (Bishop *et al.*, 2009) y la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*) (Friedrichs *et al.*, 2007; Branda *et al.*, 2013).

El hecho de que una mujer sufra mastitis o disfrute de una lactancia placentera está relacionado con una serie de factores, muchos de ellos difíciles de controlar, que predisponen a la presentación de estos cuadros o que, por el contrario, actúan como protectores. Algunos estudios epidemiológicos han investigado los factores de riesgo potenciales que podrían estar implicados en el desarrollo de esta enfermedad (Vogel *et al.*, 1999; Kinlay *et al.*, 2001; Foxman *et al.*, 2002; Amir *et al.*, 2006; Amir *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2008), pero la mayoría de estos trabajos fueron realizados hace más de una década y, en concreto en España, se carece de datos epidemiológicos acerca de esta patología. En este sentido, profundizar en el conocimiento sobre dichos factores sería esencial para identificar antes del parto o durante las primeras etapas de la lactancia a aquellas mujeres con un riesgo elevado de desarrollar mastitis. Esto permitiría diseñar estrategias para la prevención de la mastitis, así como proporcionar un asesoramiento adecuado durante la lactancia.

En este contexto, los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Realizar el análisis microbiológico de muestras de leche materna procedentes de mujeres con mastitis con el fin conocer los principales agentes etiológicos implicados en esta patología.
2. Identificar a nivel de especie una colección de cepas de estafilococos coagulasa-negativos, estreptococos del grupo *viridans* y corinebacterias, microorganismos hasta la fecha poco estudiados como causa de mastitis humana, para poder establecer su relevancia clínica.
3. Comparar el poder de discriminación de diferentes técnicas para la identificación y caracterización taxonómica de una colección de aislados del género *Streptococcus*, con el fin de analizar su diversidad en la leche humana.
4. Realizar un estudio epidemiológico caso-control sobre los factores de riesgo asociados con la mastitis infecciosa en mujeres lactantes españolas, mediante un

análisis estadístico bivalente y un modelo multivalente de regresión logística siguiendo el método *stepwise* o “paso a paso”, es decir, incluyendo gradualmente las variables.

5. Identificar los grupos de alto riesgo de desarrollar una mastitis infecciosa mediante un modelo multivalente en árbol de decisión.
6. Comparar el poder de los dos modelos multivalentes (regresión logística *stepwise* y árbol de decisión), para predecir la mastitis infecciosa utilizando factores de riesgo comunes.



## *II. Introducción*

---



## II.1. LA LACTANCIA MATERNA

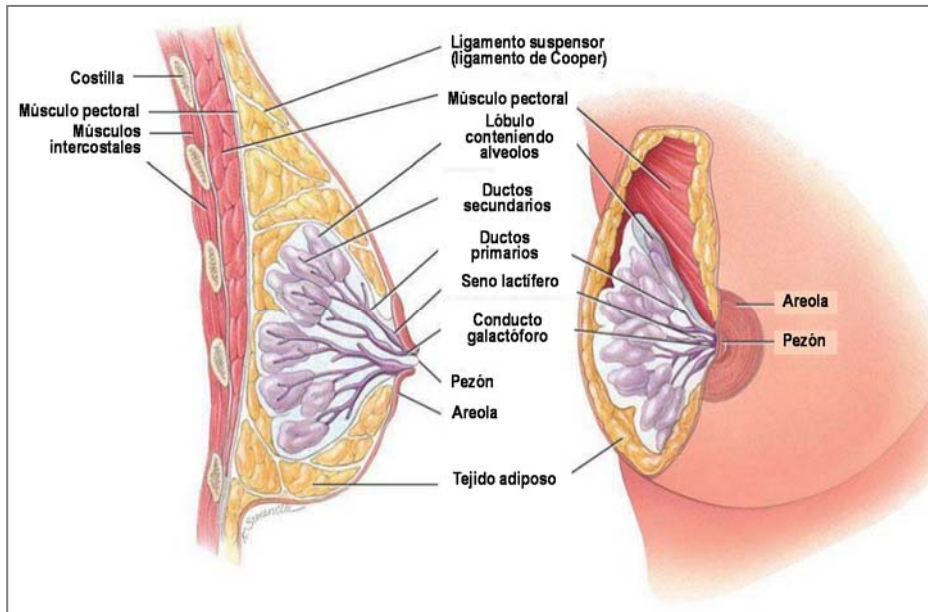
Los mamíferos recién nacidos son incapaces de ingerir la alimentación habitual del adulto. Por ello, las hembras de esta Clase zoológica presentan unas glándulas exocrinas que proporcionan un alimento específico para sus crías durante un cierto tiempo. Estas glándulas secretoras de leche son exclusivas de los mamíferos y, de hecho, dan nombre a la Clase. En la especie humana estas glándulas, que se cree provienen de glándulas sudoríparas modificadas, se localizan en la región anterosuperior lateral del tronco y, generalmente, sólo son funcionales en las hembras tras el parto. En este apartado se describirá brevemente la anatomía y fisiología de estas glándulas, que son muy activas metabólicamente en ciertos periodos. También se expondrán los beneficios que aporta la lactancia materna a los recién nacidos y a las madres (WHO/UNICEF, 2003), a pesar de que el conocimiento disponible en algunos aspectos es limitado.

### II.1.1. BREVE ANATOMÍA DE LA MAMA

En la mujer, las mamas son una pareja de protuberancias redondeadas, simétricas en relación con la línea media, que contienen las glándulas mamarias y una cantidad variable de tejido adiposo y tejido conectivo denso, que determinan su consistencia y volumen (Figura 1). La base de cada mama se extiende desde la segunda a la sexta costilla y entre el borde lateral del esternón y la línea axilar media, aunque una pequeña porción puede extenderse hacia la axila (extensión axilar). Las mamas están localizadas en la fascia superficial de la pared torácica anterior, sobre el músculo pectoral mayor; la fijación a la fascia de dicho músculo y a la dermis se hace mediante los ligamentos de Cooper. Existe una cierta separación del músculo gracias al espacio retromamario, que permite que la mama tenga una cierta movilidad (Tortora y Derrickson, 2013).

En una mujer adulta joven, cada mama tiene forma de un segmento de esfera, de unos 10-12 cm de diámetro y un espesor en la parte central de 5-7 cm (López, 2009). El embarazo y la lactancia provocan un gran aumento de su tamaño, que pasa de pesar unos 200 g en la mujer adulta no embarazada a 400-600 g en la embarazada próxima a término y 600-800 g en la mujer lactante (Lawrence y Lawrence, 2011).

En centro de la mama se encuentra la areola, una zona cutánea pigmentada, de color más oscuro y aspecto más rugoso que la piel que lo rodea, con un diámetro de 3 a 5 cm, cuyo aspecto y tamaño cambian durante el embarazo y la lactancia (Figura 1). En ella hay pequeñas protuberancias irregulares, en un número variable entre 12 y 20; son glándulas sebáceas que se conocen como glándulas de Montgomery. Su función es producir una secreción sebácea para mantener bien lubricados la areola y el pezón; también alteran el pH de la piel y evitan el crecimiento de ciertos microorganismos (Smith *et al.*, 1982).



**Figura 1.** Anatomía clásica de la glándula mamaria. Fuente: Tortora y Derrickson (2013).

El pezón se levanta como una gruesa papila con forma de cilindro o cono en el centro de la areola (Figura 1). A veces se presenta no como una protrusión sino como una depresión, denominándose a esta anomalía pezón retraído o invertido. Las dimensiones del pezón son variables aunque, por regla general, tienen relación con el tamaño de la mama. Exteriormente, el pezón es irregular y rugoso debido a la presencia de un gran número de papilas y surcos que cubren su superficie. En su extremo se observan unos orificios (una media de 4, aunque el rango oscila entre 1 y 8) para la secreción de la leche (Jütte *et al.*, 2014), que están taponados con queratina en las mujeres no lactantes. El pezón está formado por tejido eréctil, con fibras musculares lisas que se disponen circular, radial y longitudinalmente y actúan como un esfínter.

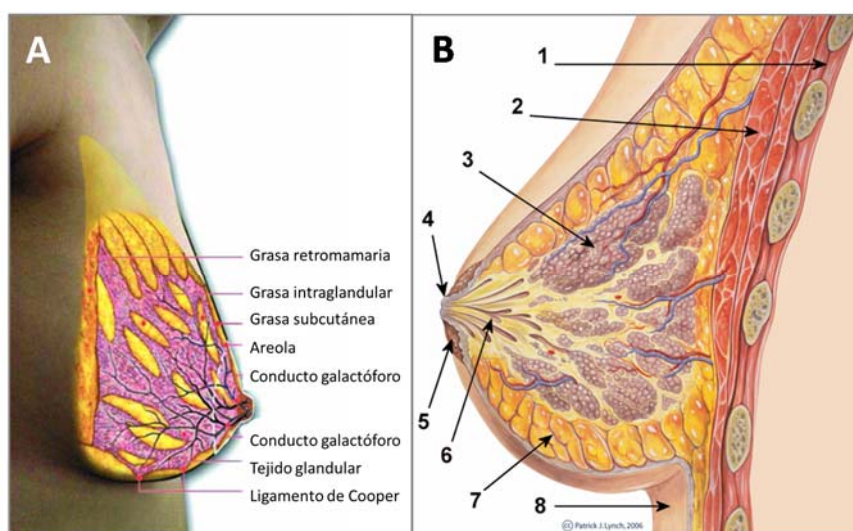
## II.1.2. ESTRUCTURA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria no es en realidad una, sino muchas, ya que en cada mama se encuentran entre 15 y 25 lóbulos glandulares dispuestos de forma radial hacia el pezón (Figura 1). Cada lóbulo glandular es una unidad autónoma que consta de un conducto excretor central (conducto galactóforo o lactífero) que se ramifica en múltiples niveles de conductos a partir del pezón hasta acabar en el extremo más distal en pequeños lobulillos. La leche que se produce en esos lobulillos secretores (acinos o alvéolos) se transporta gracias a todo el sistema de conductos hasta el pezón (Ramsay *et al.*, 2005). El conjunto de estructuras secretoras y de transporte de la leche está

embebido en una densa matriz de tejido conectivo y adiposo que proporciona soporte estructural.

Contrariamente a lo que se ha representado tradicionalmente en muchos libros y revistas profesionales, parece que los conductos galactóforos no se dilatan (los antiguos senos lactíferos) justo antes de llegar al pezón (como se muestra, por ejemplo, en la Figura 1). Esa dilatación, que se pensó era un reservorio para almacenar leche, es fruto de un artefacto debido a la inyección de cera caliente en los conductos distensibles al realizar los primeros trabajos para estudiar la estructura de la glándula mamaria (Cooper, 1845).

El empleo de modernas técnicas de análisis con ultrasonidos ha revelado que, en vez de dilataciones, por debajo de la areola los ductos comienzan a ramificarse justo por debajo del pezón y hay tejido glandular igual que en el resto de la mama. Es decir, fisiológicamente, los conductos principales sólo se dilatan después de la eyección de leche y su función es exclusivamente la de transportar la leche hacia el pezón (Ramsay *et al.*, 2005; Gooding *et al.*, 2010) (Figura 2). Sin embargo, parece que sí se almacena algo de leche para proporcionar una gratificación inmediata al lactante, pero esta función la realiza el conjunto del sistema ductal (Gooding *et al.*, 2010).

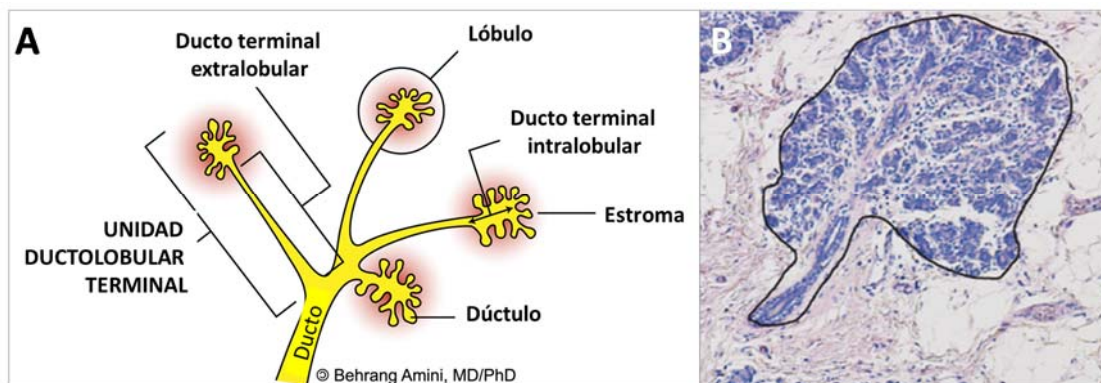


**Figura 2.** Anatomía revisada de la glándula mamaria. A. Dibujo basado en estudios realizados con ultrasonidos. Fuente: Ramsay *et al.* (2005). B. Diagrama del sistema ductal de la mama. 1, Caja torácica; 2, Músculos pectorales; 3, Lóbulos; 4, Superficie del pezón; 5, Areola; 6, Conducto galactóforo; 7, Tejido adiposo; 8, Piel. Fuente: PJ Lynch y CC Jaffe (Creative Commons Attribution 2.5, Breast anatomy normal.jpg).



Se han identificado unos 9 conductos lactíferos en la mama de la mujer lactante, aunque dependiendo del individuo pueden encontrarse entre 4 y 18, con un diámetro medio que oscila entre 1 y 4,4 mm que aumenta hasta 10 mm para acomodar la leche cuando se produce la eyección (Ramsay *et al.*, 2005). No todo el sistema de ductos y lóbulos parece estar activo durante la lactancia; de hecho, el número de conductos lactíferos supera al de aperturas que existen en el pezón (Gooding *et al.*, 2010).

La unidad funcional de la glándula mamaria humana son las unidades ductolobulares terminales, que constan de un ducto terminal extralobular y de ductos terminales intralobulares (Figura 3). Estos últimos forman el espacio central del lóbulo y tienen múltiples evaginaciones denominadas dúctulos, que se diferenciarán como unidades secretoras (acinos o alvéolos) durante la lactancia.



**Figura 3.** Estructura de la unidad ductolobular terminal. **A.** Esquema de la estructura. Fuente: B Amini (<http://roentgenrayreader.blogspot.com.es/>). **B.** Fotografía de un corte histológico de glándula mamaria no lactante mostrando una unidad ductolobular terminal (delimitada con una línea negra). Fuente: Johnson (2010).

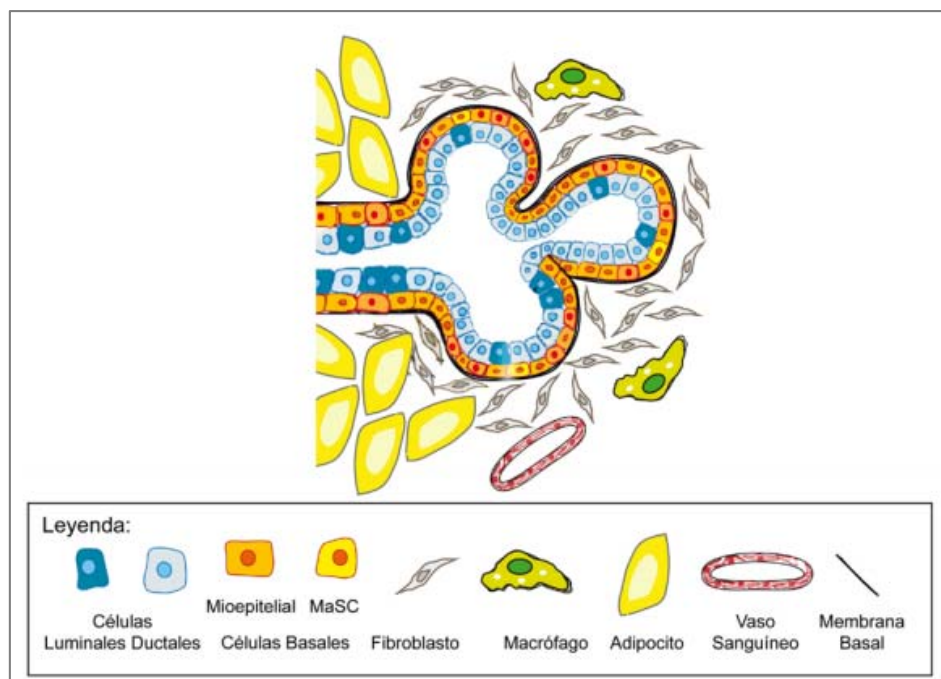
### II.1.3. HISTOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria se clasifica como un epitelio túbuloalveolar ramificado, aunque los verdaderos alvéolos no se desarrollan hasta el embarazo. Los conductos están tapizados con una capa de epitelio columnar o cuboide que tiene dos células de espesor en los de gran tamaño y una en los ductos más pequeños y los alvéolos (Johnson, 2010). Las células de este epitelio llevan a cabo la principal función de la mama, que es la producción de leche, teniendo un gran potencial secretor.

Como en cualquier otro epitelio, la impermeabilidad del epitelio secretor se consigue gracias a complejas uniones entre las células, que incluyen zonas de oclusión,

zonas de adhesión y desmosomas. Las zonas de oclusión forman una banda continua alrededor de la célula en la superficie lateral próxima a la zona apical, regulando la barrera celular y el transporte paracelular de sustancias. Las zonas de adhesión se disponen inmediatamente debajo formando también una banda alrededor de la célula. Y, por último, los desmosomas aparecen como parches por debajo de las zonas de adhesión (Owens *et al.*, 2013).

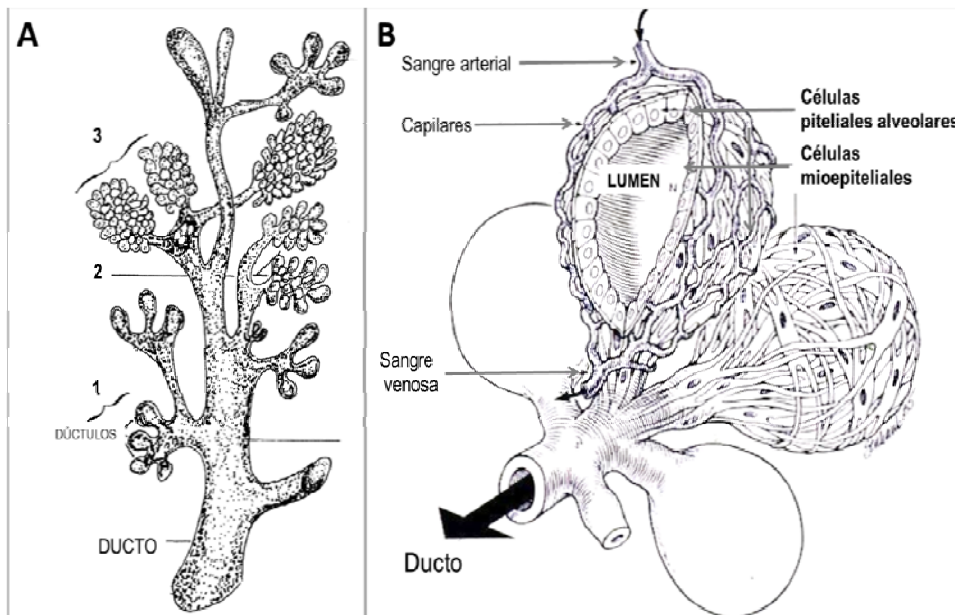
En la glándula mamaria también hay numerosas células mioepiteliales que forman una capa alrededor de los ductos y alveolos, entre las células epiteliales y la membrana basal (Figura 4). Las células mioepiteliales son tan numerosas en los conductos que llegan a formar una capa completa mientras que en los alveolos se disponen formando una especie de malla (Figura 5). Se trata de células epiteliales con muchos rasgos en común con las células del tejido muscular liso. Su principal función es la de contraerse para expulsar la leche hacia el pezón. También contribuyen a establecer la polaridad de las células epiteliales y al desarrollo de la glándula mamaria y la diferenciación celular (Johnson, 2010).



**Figura 4.** Principales tipos celulares presentes en la glándula mamaria. El tejido epitelial mamario presenta una estructura ductal. Los ductos están formados por células ductales y basales (células mioepiteliales y células madre de la glándula mamaria [MaSCs]). El estroma está formado por adipocitos, fibroblastos y macrófagos. Fuente: Joshi *et al.* (2012).

#### II.1.4. DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

Como se describe a continuación, el desarrollo de la glándula mamaria comienza durante la embriogénesis pero la mayor parte se produce en una etapa posterior y culmina durante la lactancia. En este desarrollo están implicados muchos sistemas e implica profundos cambios en su tamaño, forma y función.



**Figura 5.** Estructura lobular de la glándula mamaria. **A.** Representación de las distintas etapas de desarrollo. 1, Lóbulo en mujer adolescente virgen; 2, Lóbulo en mujer adulta no lactante; 3, Lóbulos diferenciados en mujer lactante. Fuente: Russo y Russo (2004). **B.** Representación esquemática de la estructura de un alveolo (Adaptado de <https://www.studyblue.com/notes/note/n/reproductive-physiology/deck/6526125>).

##### II.1.4.1. Periodo embrionario

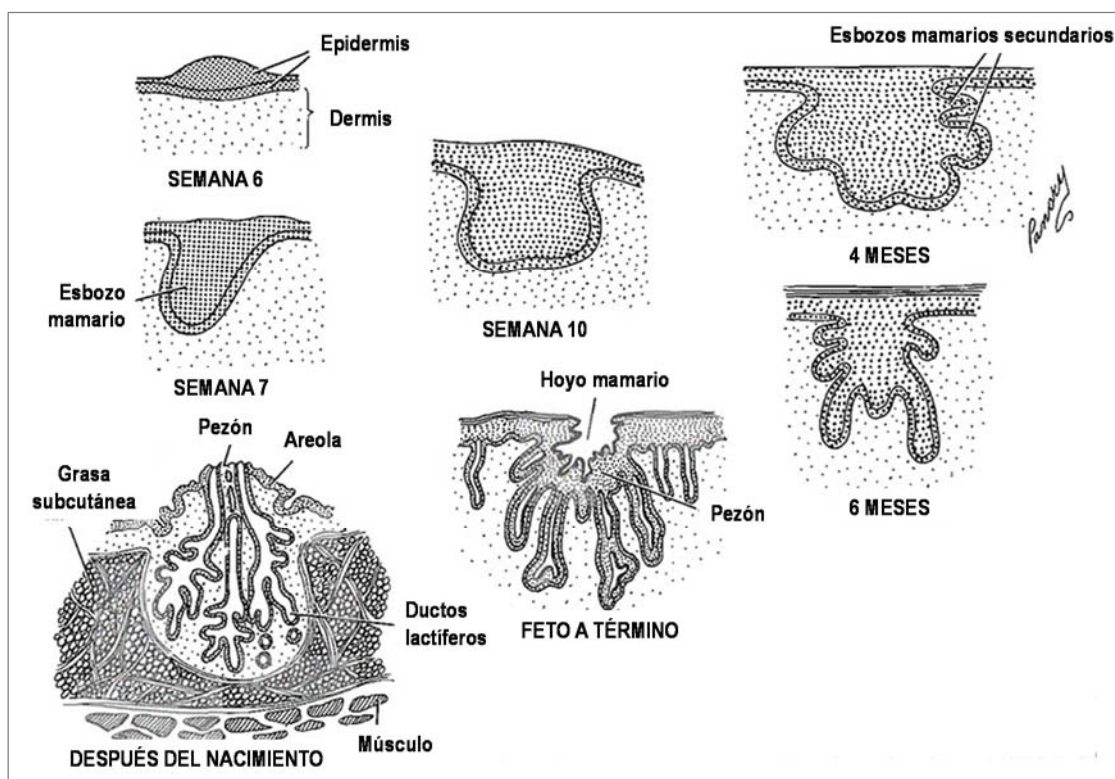
La glándula mamaria comienza a formarse en la 4ª semana de gestación, con el engrosamiento del ectodermo hacia el tejido mesodérmico subyacente, en las denominadas líneas mamarias, paralelas a cada lado de la línea media corporal. Es en esta línea, en la zona torácica, donde se desarrollan los esbozos mamarios cuando el feto tiene entre 3 y 7 cm (Ofteidal, 2002; Vorbach *et al.*, 2006) (Figura 6).

Cuando el feto mide aproximadamente 10 cm (unas 12-16 semanas de gestación), comienza la ramificación; la yema primaria se expande y forma yemas secundarias que forman invaginaciones epiteliales. En ese momento las células

comienzan a organizarse en grupos que, posteriormente, formarán los conductos. Éstos se elongarán e invadirán el mesénquima y continuarán desarrollándose hasta el nacimiento (Gusterson y Stein, 2012) (Figura 6).

#### II.1.4.2. Del nacimiento a la pubertad

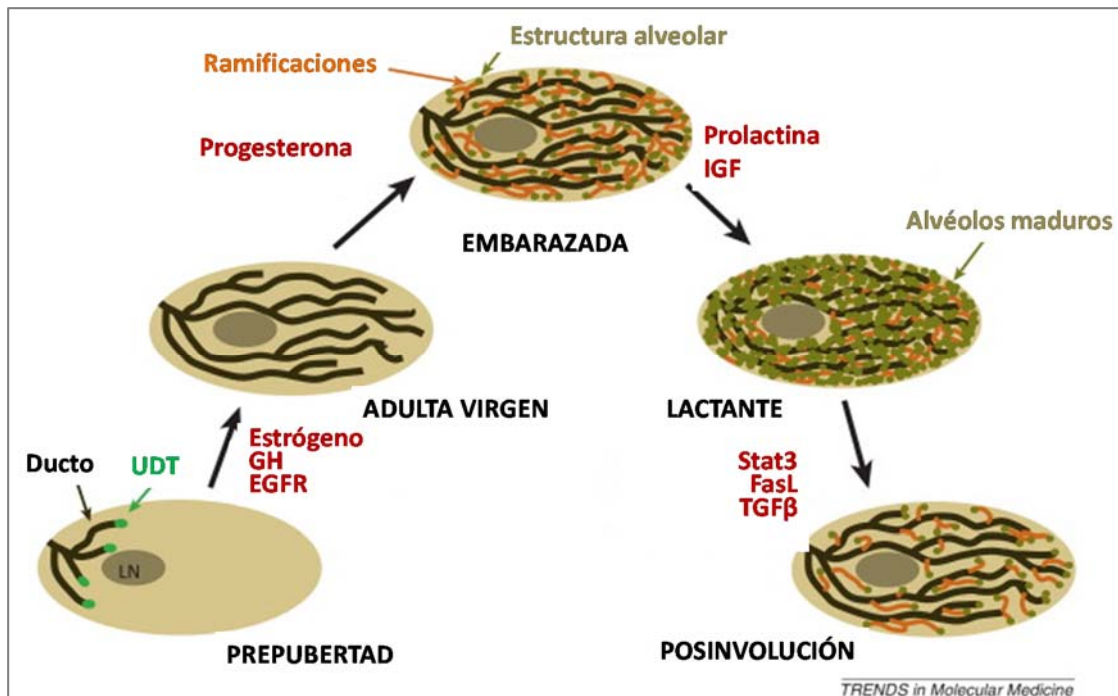
Al nacer, la glándula mamaria es una rudimentaria estructura de pequeños elementos ductales que está embebida en el tejido graso subdérmico (Hogg *et al.*, 1983) (Figura 6). La estructura ductal presenta una capa interna de células luminales ductales rodeada por otra capa externa de células basales mioepiteliales. Esta estructura básica es competente para responder a las hormonas y puede tener actividad secretora. Es lo que se conoce en Pediatría como “leche de bruja”. Esta secreción de las glándulas mamarias de los recién nacidos cesa a partir de las dos semanas del nacimiento, cuando las hormonas residuales en el recién nacido procedentes de la madre comienzan a desaparecer (Madlon-Kay, 1986). Durante los dos primeros años de vida continúa la ramificación y el desarrollo de los lóbulos terminales. A partir de ese momento, la glándula mamaria entra en un periodo de reposo hasta la pubertad, teniendo tan solo un desarrollo acorde al corporal.



**Figura 6.** Desarrollo embrionario de la glándula mamaria. Fuente: Pansky (1982).

### II.1.4.3. Pubertad

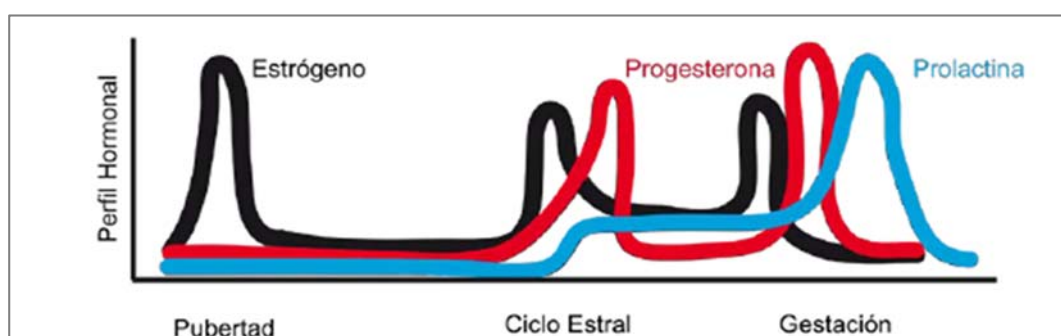
En esta etapa, y en respuesta a las hormonas que se producen cuando se inicia el funcionamiento del eje endocrino hipotálamo-hipófisis-ovario, el epitelio evoluciona de la primitiva estructura ductal presente al nacer a una estructura madura formada por conductos y lóbulos imbricados en el tejido adiposo mamario (Briskin y O'Malley, 2010). Precisamente, la mayor parte de la ramificación de la glándula mamaria se produce en esta etapa por la acción continua de hormonas, especialmente de los estrógenos (Figura 7). Los conductos se elongan y bifurcan a través del tejido adiposo gracias a la presencia de una gran cantidad de células epiteliales con una enorme capacidad proliferativa en los extremos distales de los ductos, donde también se forman numerosos ductúlos. A los 18 años la arquitectura del parénquima está definida.



**Figura 7.** Desarrollo esquemático posnatal de la glándula mamaria. EGFR: receptor para el factor de crecimiento epidérmico; FasL: ligando Fas; GH: hormona del crecimiento; IGF: factor de crecimiento insulínico; STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3; TGFβ: factor de crecimiento transformante beta 1; UDT: unidad ductotubular terminal o lobulillos terminales. Fuente: Meier-Abt y Bentires-Alj (2014).



Una vez que se ha desarrollado toda la estructura ramificada, regularmente se producen fenómenos de proliferación y apoptosis en respuesta a los cambios hormonales asociados al ciclo menstrual (Figura 8). Sin embargo, el desarrollo que se produce en cada ciclo menstrual nunca vuelve completamente a la situación inicial y, por ello, el desarrollo y la formación de ductos procede lenta pero continuamente hasta los 35 años. En cuanto a la función secretora, la glándula permanece inactiva hasta el embarazo, momento en que se producirán los cambios más drásticos. Hasta el embarazo, los lóbulos de la glándula mamaria consisten esencialmente en ductos y sólo hay presentes un pequeño número de alvéolos durante la fase luteal del ciclo menstrual.



**Figura 8.** Perfil hormonal durante la pubertad, los ciclos estrales y la gestación.  
Fuente: Joshi *et al.* (2012).

#### II.1.4.4. Embarazo

En esta etapa la glándula mamaria alcanza el máximo desarrollo con el objetivo de prepararse para la lactancia (Meier-Abt y Bentires-Alj, 2014). La placenta produce estrógenos y progesterona, relevando al cuerpo lúteo; al final del embarazo los niveles de estrógenos y progesterona son unas 30 y 10 veces, respectivamente, superiores a los niveles previos a la concepción. Los estrógenos, con la colaboración de la progesterona, preparan la mama para la lactancia, promoviendo su aumento de tamaño y el crecimiento del sistema ductal, mientras que la progesterona promueve la diferenciación de los alvéolos (Figuras 7 y 8). A la acción de estas hormonas se suman las de otras, como la prolactina, la hormona del crecimiento y las hormonas tiroideas, entre otras (LaMarca y Rosen, 2008).

Durante la primera mitad del embarazo hay una proliferación celular muy intensa, aumentando el número y el tamaño de las células, la ramificación de los ductos y el número de lóbulos y alvéolos en cada lóbulo. Además, las células epiteliales luminales se diferencian a células que tienen una morfología celular

secretora típica (Figura 9). También se observa un marcado cambio en el metabolismo lipídico en las células epiteliales y adipocitos para aumentar la disponibilidad de ácidos grasos. Por su parte, la vasculatura se expande de tal forma que al final del embarazo cada acino está rodeado de vasos sanguíneos, para facilitar el transporte de oxígeno y nutrientes a las células epiteliales.

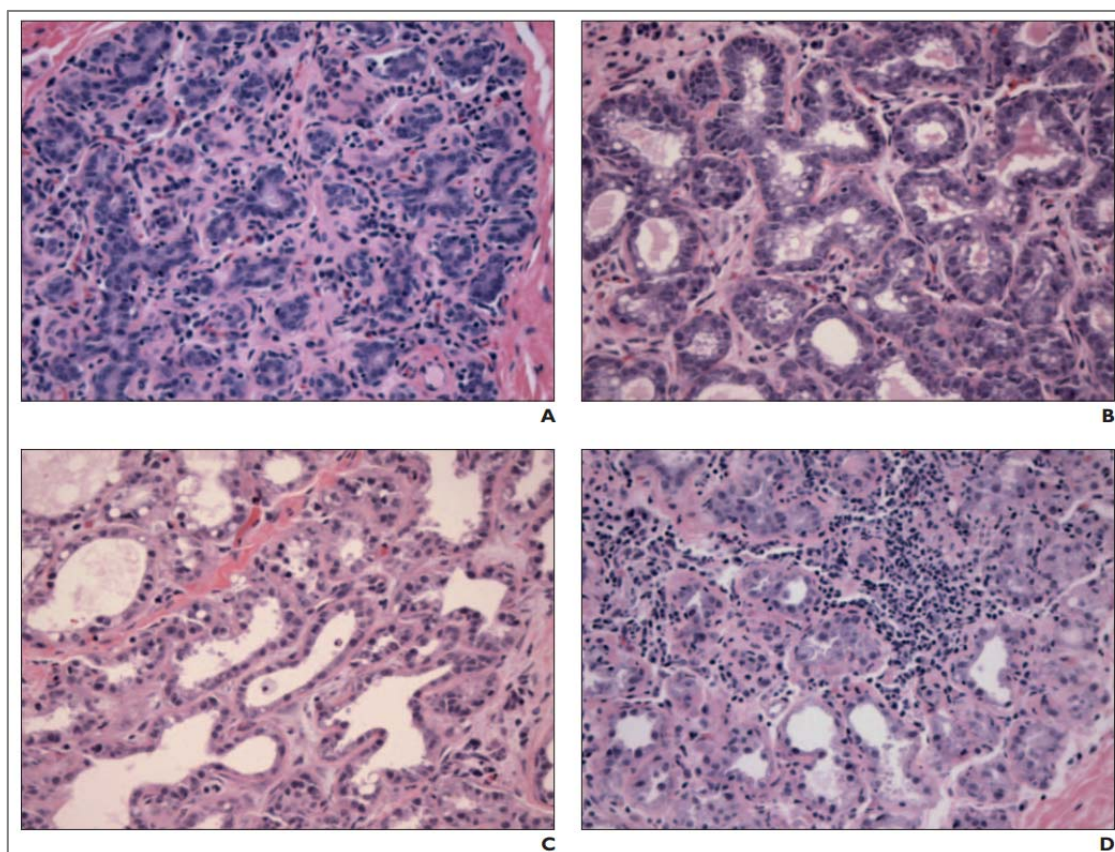
Hacia la mitad del embarazo se observa un aumento de la formación del mRNA necesario para la síntesis de muchas enzimas y proteínas que formarán parte de la leche. En la mayoría de las mujeres la excreción de lactosa por la orina comienza entre las 15 y 20 semanas de gestación y se considera un indicador del comienzo de la lactogénesis (Cregan y Hartman, 1999).

Esta expansión tisular se detiene al final de la primera mitad del embarazo. La estructura lobuloalveolar ya está establecida y comienza, entonces, la diferenciación secretora transformándose los ductos en alvéolos. En el último trimestre las células comienzan a sintetizar proteínas y gotas de lípidos que se acumulan en el citoplasma celular. Las células lumbinales tienen un retículo endoplasmático prominente, un aparato de Golgi hipertrofiado y las mitocondrias hinchadas, pero la diferenciación a células secretoras todavía no es máxima. Por ello, la glándula mamaria puede empezar a producir un líquido rico en proteínas, sobre todo anticuerpos, cuya composición es más próxima a la del plasma sanguíneo que a la de la leche (“precalostro”) (Russo y Russo, 2004). Esta etapa de diferenciación que habilita al epitelio para la secreción de leche se denomina lactogénesis I.

#### **II.1.4.5. Lactancia**

Al final del embarazo la glándula mamaria está compuesta por estructuras epiteliales con la máxima diferenciación celular que están preparadas para comenzar la secreción de leche en respuesta a la baja del nivel de progesterona tras el parto. La producción de una copiosa cantidad de leche es lo que se conoce como lactogénesis II. Se inicia con la producción de calostro, que se caracteriza por su riqueza en proteínas, siendo la producción de leche patente a los 3–7 días posparto. El volumen de leche producida aumenta rápidamente desde unos 5-50 mL/día el día siguiente al parto hasta 500 mL/día pasados 5 días (Neville y Morton, 2001).

Durante la lactancia los lóbulos aumentan aún más de tamaño y el lumen de los acinos se dilata y llena con micelas de caseína y glóbulos de grasa. No hay muchas modificaciones con respecto a la glándula mamaria de la mujer gestante, excepto que los productos de secreción dilatan ostensiblemente los ductos y los acinos. Por otra parte, también aumenta el número de células mioepiteliales, que completan su diferenciación al iniciarse la lactancia.



**Figura 9.** Cambios histológicos en la glándula mamaria. Muestras de tejido de: **A**, mujer (25 años) no embarazada; el lumen de los lóbulos está colapsado. **B**, mujer (33 años) embarazada; el tamaño de los lóbulos ha aumentado a expensas del tejido adiposo interlobular y el lumen de los alveolos está lleno con secreción eosinofílica. **C**, mujer (29 años) a las 2 semanas posparto; los lóbulos están marcadamente distendidos por la presencia de secreción y las células epiteliales tienen el citoplasma vacuolado. **D**, mujer (27 años) tras cesar la lactancia; los lóbulos han empezado a involucionar y se observa infiltración de células mononucleadas en el estroma intralobular. Fuente: Vashi *et al.* (2013).

Durante la lactancia, la síntesis de la leche está regulada por el apetito del lactante, porque depende del grado de vaciado de la glándula mamaria durante cada toma y, probablemente, de la frecuencia. Al cabo de varios meses de lactancia, tanto si continúa la lactancia materna exclusiva como si se introducen otros alimentos, la capacidad secretora del pecho disminuye. Se desconoce si se debe al envejecimiento de las células secretoras o a una respuesta programada por cambios neuroendocrinos.

Durante la lactancia distintas células del sistema inmunológico, incluyendo linfocitos B y T y macrófagos, se infiltran en la glándula mamaria (Reed y Schwertfeger, 2010). Se ignora si intervienen en la función del epitelio durante la lactancia, pero son fundamentales para transferir inmunidad pasiva al recién nacido.



#### II.1.4.6. Etapas posteriores a la lactancia

La tasa de síntesis y secreción de leche comienza a disminuir cuando la leche se ha almacenado durante 48 h; el estasis de leche es un inductor primario de la involución de la glándula mamaria humana (Russo y Russo, 2014). Aunque el tamaño y actividad secretora de la glándula mamaria humana disminuyan rápidamente cuando el lactante comienza a ingerir otros alimentos, esta primera fase de la involución (cese de secreción y pérdida del fenotipo celular alveolar) es reversible si el amamantamiento prosigue. En caso contrario, comienzan a producirse fenómenos de apoptosis y fagocitosis en las células de los alvéolos. Esto lleva aparejado la inactivación de muchos genes implicados en la síntesis de compuestos presentes en la leche y la activación de otros muchos relacionados con la apoptosis. Además, se observa una intensa autofagia en el epitelio luminal, con aumento de enzimas lisosomales y de vacuolas conteniendo orgánulos en distintas etapas de degradación. También aumenta la infiltración de macrófagos, probablemente implicados en la eliminación de células degeneradas y restos celulares (O'Brien *et al.*, 2012). Por último, se observa cierta regeneración de tejido conjuntivo, aunque la mama de una mujer lactante siempre conserva más tejido glandular que la de una mujer que no ha lactado (Forsman y Schwertfeger, 2013).

Con el cese permanente del ciclo menstrual y el consiguiente declive en la producción de hormonas esteroideas ováricas, la glándula mamaria sufre una regresión, disminuyendo el número de lóbulos diferenciados (Howard y Gusterson, 2000). En esta etapa, además, se constata una reducción del número total de lóbulos y ductos, un reemplazo de tejido conectivo laxo por colágeno y una sustitución del epitelio glandular y el tejido conectivo interlobular por grasa.

#### II.1.5. COMPOSICIÓN QUÍMICA BÁSICA DE LA LECHE

La leche es un fluido biológico singular producido por los mamíferos que ha sido diseñado para cubrir las necesidades específicas de los recién nacidos de cada especie, incluyendo no solo las nutritivas. Por ello, es un fluido con una gran complejidad composicional en el que se encuentran glúcidos, lípidos, proteínas, vitaminas, minerales, nucleótidos y diversos compuestos bioactivos (Tablas 1 y 2). Su producción y composición relativa son flexibles y varían dependiendo de numerosos factores entre los que cabe mencionar el tiempo de lactancia o el estado nutritivo de la madre.

La lactosa, formada por glucosa y galactosa, es el disacárido mayoritario (6,8%) y exclusivo de la leche (Newburg, 2013). Es el componente menos variable de la leche y regula la cantidad de leche producida. Es fácilmente hidrolizada por la  $\beta$  galactosidasa (lactasa) presente en el intestino del neonato y, por ello, es una importante fuente de energía para el lactante.

**Tabla 1.** Composición bioquímica y energía del calostro y la leche madura

<b>Componente (por L)</b>	<b>Calostro</b>	<b>Leche madura</b>
<b>Energía (kJ)</b>	2,431	2,835
<b>Glúcidos totales (g)</b>	50 – 70	70 – 85
Glucosa (g)	0,2 – 1,0	0,2 – 0,3
Lactosa (g)	30 – 50	67 – 70
Oligosacáridos (g)	22 – 24	5 – 15
<b>Lípidos totales (g)</b>	15 – 20	35 – 48
Triacilglicéridos (g)	14,5 – 19,5	34 – 47
Ácidos grasos (g)	13 – 17	30 – 42
Colesterol (g)	0,2 – 0,3	0,1 – 0,2
Ésteres de colesterol (g)	0,05	0,01
Fosfolípidos y esfingolípidos (g)	– <sup>a</sup>	0,25 – 0,30
<b>Nitrógeno total (g)</b>	3	1,9
Nitrógeno no proteico (g)	0,5	0,45
Nitrógeno proteico (g)	2,5	1,45
<b>Proteínas totales (g)</b>	15 – 20	8 – 11
<i>Caseína (g)</i>	3,8	3 – 5
Caseína $\beta$ (g)	2,6	3 – 4
Caseína $\alpha$ (g)	1,2	1 – 2
<i>Proteínas del suero (g)</i>	11 – 15	5 – 6
$\alpha$ -lactoalbúmina (g)	3,6	2 – 3
IgM (g)	0,02	0,01
IgG (g)	0,01	0,05
Lactoferrina (g)	3,5	1 – 3
Lisozima (g)	0,1 – 0,2	0,1
IgA secretora (g)	2	0,5 – 1,0
Seroalbúmina (g)	0,4	0,3

<sup>a</sup>No indicado

Fuente: Donovan (2008).

Además, en comparación con la leche de otras especies, la humana contiene una elevada cantidad de oligosacáridos (HMOs, del inglés *Human Milk Oligosaccharides*) (0,7-1,2 g/100 mL) (Boehm y Stahl, 2007). En esta fracción se encuentran más de cien moléculas distintas, cuya estructura está formada por hasta 12 residuos de monosacáridos a los que se pueden unir residuos de fucosa o ácido siálico (Urashima *et al.*, 2012). Estos HMOs no son metabolizados por las enzimas del tracto digestivo del lactante, pero promueven una correcta colonización intestinal porque son utilizados por ciertas bacterias, como las pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y *Staphylococcus*; es decir, tienen acción prebiótica (Asakuma *et al.*, 2011; Hunt *et al.*, 2012). Otra importante función de los HMOs es la protección frente a infecciones (apartado II.1.9.1.2).

**Tabla 2.** Composición en vitaminas y minerales del calostro y la leche madura

	<b>Calostro</b>	<b>Leche madura</b>
<b>Vitaminas hidrosolubles</b>		
Ácido ascórbico (mg)	80 – 100	40 – 100
Ácido pantoténico (mg)	2,5	2–2,5
Biotina (µg)	4,5	5 – 9
Folato (µg)	5 – 10	50 – 100
Niacina (mg)	0,5d	1,5 – 2
Piridoxina, B <sub>6</sub> (µg)	20 – 40	90 – 300
Riboflavina, B <sub>2</sub> (µg)	500	300 – 400
Tiamina, B <sub>1</sub> (µg)	20	160 – 210
Vitamina B <sub>12</sub> (µg)	1,2 – 1,5	0,5 – 0,8
<b>Vitaminas liposolubles</b>		
Vitamina A y carotenoides		
Ésteres de retinol (µmol)	1,45–2,00	1,22
Carotenoides totales (µmol)	5,35	1,8 – 3,0
Caroteno α (µmol)	0,17	0,02 – 0,03
Caroteno β (µmol)	0,42	0,04 – 0,07
Criptoxantina β (µmol)	0,23	0,03 – 0,06
Luteína/zeaxantina (µmol)	0,20	0,04 – 0,10
Licopeno (µmol)	0,51	0,02 – 0,06
Vitamina D <sub>3</sub> (colecalfiferol) (µg)	0,1 – 0,3	0,1 – 1,0
Vitamina E (colecalfiferol) (µg)		
Tocoferol α (mg)	15	3 – 5
Tocoferol γ (mg)	1,5	1,0
Vitamina K		
Filoquinona, K <sub>1</sub> (µg)	1,8 – 2,3	1,5 – 3,0
Menaquinona, K <sub>2</sub> (µg)	2,4 – 2,6	1,2 – 2,0
<b>Minerales</b>		
Boro (µg)	30	28
Calcio (mg)	250	200 – 250
Cloro (mg)	600 – 800	400 – 450
Cobre (mg)	0,5 – 0,8	0,1 – 0,3
Cromo (µg)	17	25 – 75
Flúor (µg)	5 – 20	4 – 15
Fósforo (mg)	120 – 160	120 – 140
Iodo (µg)	40 – 50	140 – 150
Magnesio (mg)	30 – 35	30 – 35
Manganeso (µg)	5 – 12	3 – 4
Potasio (mg)	600 – 700	400 – 550
Selenio (µg)	235 – 32	10 – 25
Sodio (mg)	300 – 400	150 – 250
Zinc (mg)	5 – 12	1 – 3

<sup>a</sup> No indicado

Fuente: Donovan (2008).

Los lípidos de la leche humana (3,8-3,9 g/100 mL) están compuestos por una compleja mezcla de triacilglicéridos (98%), fosfolípidos (0,8%) y colesterol (0,5%), entre otros, que constituyen el 50-60% de las calorías que ingiere el lactante (Kolezko *et al.*, 2001). Además, proporcionan nutrientes esenciales como vitaminas liposolubles y ácidos grasos poliinsaturados esenciales (ácidos linoleico y linolénico), necesarios para la síntesis de membranas y de eicosanoides y otros compuestos bioactivos. Estos lípidos se secretan emulsionados en forma de glóbulos grasos que tienen entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  de diámetro. En estos glóbulos grasos los triacilglicéridos se disponen en el interior y los fosfolípidos, colesterol y proteínas con actividad biológica (xantina oxidasa, adipofilina, mucinas, lactaderina, butirofilina y CD36) lo hacen en el exterior. La estructura del glóbulo graso es de gran importancia metabólica y facilita la digestión por parte del lactante (Bourlieu y Michalski, 2015). Por otra parte, la grasa es el componente más variable de la leche y lo hace en función de la dieta materna, etapa de la lactancia (suele ser mayor en la leche madura que en el calostro) así como del momento del día y de la toma, entre otros. Generalmente, el contenido en grasa es mayor en mujeres con una nutrición equilibrada, en la leche madura (en comparación con el calostro), y después de la comida principal y al final de la toma.

Las proteínas tienen un perfil de aminoácidos esenciales idóneo para el desarrollo y crecimiento del recién nacido (Lawrence y Lawrence, 2011). Las más abundantes son las proteínas del suero, que están disueltas en la fracción soluble y participan en la proliferación celular, el metabolismo lipídico, el transporte de nutrientes y la función inmunológica (D'Alessandro *et al.*, 2010). Las caseínas se encuentran en baja proporción, lo que le da un aspecto menos opaco en comparación con la de otras especies. Las caseínas se encuentran interaccionando entre sí formando una dispersión coloidal de partículas esféricas denominadas micelas, que contienen grandes cantidades de calcio y fosfato. Además de servir de fuente de aminoácidos esenciales, las proteínas tienen muchas funciones fisiológicas e inmunológicas (apartado II.1.9.1.2).

Por otra parte, la leche materna es fuente de una gran diversidad de compuestos con actividad biológica que contribuyen al adecuado desarrollo del lactante (Tabla 3).

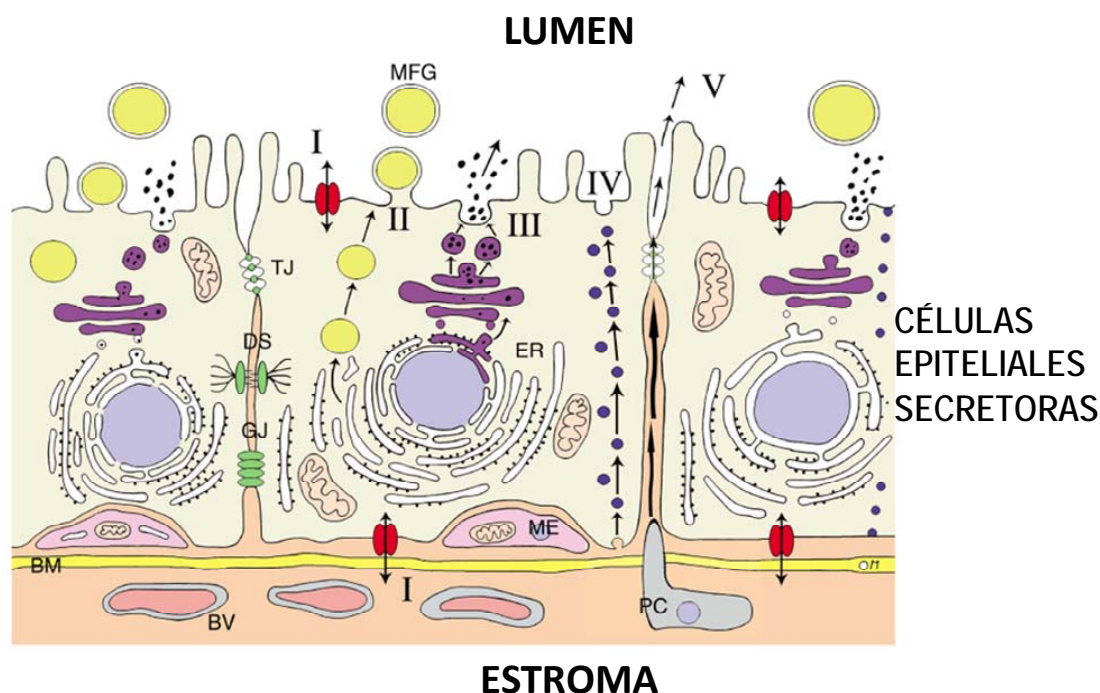
## II.1.6. BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LA LECHE

Como ya se ha indicado, la biosíntesis y secreción de la leche no son funciones constitutivas de la glándula mamaria, sino que suceden en momentos puntuales del ciclo vital. Entender cómo se produce la leche no es una tarea sencilla por la gran complejidad de sus componentes y la variedad de procesos que median su secreción. Algunos se sintetizan en las células epiteliales secretoras de los alvéolos, mientras que otros se transportan desde la sangre. La integración de las distintas sustancias presentes en la leche se realiza mediante cinco vías o mecanismos que operan paralelamente (Neville *et al.*, 1983) (Figura 10).

**Tabla 3.** Actividad biológica de los principales componentes de la leche humana

<b>PROTEÍNAS y PÉPTIDOS</b>	Caseínas	Transporte de minerales (Ca, Fe, Zn, Cu) Precursoras de péptidos bioactivos
	Glicomacropéptido	Actividad antiviral Factor bifidogénico Precursor de péptidos bioactivos
	Lactoferrina	Absorción de hierro Actividad antimicrobiana Actividad antioxidante Inmunomodulación
	Lisozima	Actividad antimicrobiana
	Inmunoglobulinas	Protección inmunológica
	$\alpha$ -Lactalbúmina	Síntesis de lactosa en glándula mamaria Transporte de calcio Actividad anticarcinogénica (HAMLET)*
	Glutathion peroxidasa Catalasa Superóxido dismutasa	Actividad antioxidante
<b>LÍPIDOS</b>	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AA, DHA)	Desarrollo neurológico Desarrollo cognitivo Función visual
	Ácidos grasos de cadena corta	Actividad antimicrobiana Actividad anticarcinogénica Protección del epitelio intestinal
	Ácido linoleico conjugado	Actividad anticarcinogénica Factor de crecimiento
<b>GLÚCIDOS</b>	Oligosacáridos (HMOs)	Prebióticos Actividad antimicrobiana y antivírica
	Mucinas	Ligandos para proteínas
<b>OTROS</b>	Poliaminas	Maduración, desarrollo del epitelio intestinal Inmunomodulación
	Nucleótidos y nucleósidos	Inmunomodulación Desarrollo, funcionamiento del epitelio intestinal Metabolismo lipídico
	Hormonas y factores de crecimiento	Regulación de distintas funciones
	Microbiota comensal	Colonización del intestino Protección frente a infecciones Desarrollo del sistema inmunitario Desarrollo cognitivo
	Células del sistema inmunitario	Protección inmunológica
	Membrana del glóbulo graso	Protección frente a infecciones

\*En asociación con el ácido oleico induce apoptosis de tumores y sensibiliza a los patógenos frente a los antibióticos (HAMLET, del inglés *Human Alpha-lactoalbumina Made LEthal to Tumor cells*). Adaptado de Donovan (2008) y Hamosh (2001).



**Figura 10.** Representación de las cinco vías de transporte de los componentes de la leche a través del epitelio secretor de la glándula mamaria. I: Difusión a través de las membranas apical y basal de las células epiteliales secretoras; II: Excreción de la grasa como glóbulos de grasa con membrana; III, Exocitosis; IV, Transcitosis; y V: Vía paracelular. BM, membrana basal; BV, vaso sanguíneo; DS, desmosoma; ER, retículo endoplasmático; GJ, unión tipo gap; ME, célula mioepitelial; MFG, glóbulo de grasa; PC, célula del sistema inmunológico; TJ, zona de oclusión. Fuente: *Role of membrane transporters in mammary gland biology* (Institute of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Bern)

Cada célula secretora de la glándula mamaria funciona como una unidad completa, produciendo leche con todos sus constituyentes y de una forma continua. Para ello, las células sufren diversas adaptaciones metabólicas que les permiten sintetizar numerosos componentes de la leche (lactosa, caseína...) (Ben-Jonathan *et al.*, 2006). Algunos de estos mecanismos son comunes a otros tejidos (páncreas, hígado o glándulas salivales); otros, como la secreción de grasa, son exclusivos de la glándula mamaria.

El agua, iones monovalentes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), urea y algunos monosacáridos (glucosa) difunden libremente o son transportados mediante proteínas específicas a través de las membranas apicales de las células alveolares hacia el lumen alveolar (I, Figura 10). El agua, como se ha indicado, se mueve de acuerdo a un gradiente osmótico impuesto por la lactosa.

Los triglicéridos se sintetizan en el retículo endoplásmico liso a partir de ácidos grasos y glicerol, formando gotas lipídicas citoplasmáticas que se desplazan hacia la membrana apical de la célula secretora (II, Figura 10). Una vez allí, estas gotas quedan envueltas por completo por una porción de la membrana celular, incluyendo una pequeña porción del citoplasma, hasta separarse de la célula, formándose el glóbulo de grasa (Neville *et al.*, 2001). A este mecanismo se le denomina secreción apocrina de lípidos. Se desconoce el porqué de la existencia de este mecanismo alternativo al aparato de Golgi para la secreción de lípidos, aunque es posible que pueda estar relacionado con una mayor eficiencia (Monks y McManaman, 2013). La formación de los glóbulos de grasa impide la coalescencia de las gotas de grasa entre sí, facilitando su transporte a través de los conductos. Además, la membrana del glóbulo tiene numerosas funciones biológicas, aparte de la emulsificación de la grasa (López y Menard, 2011).

La lactosa se sintetiza en el aparato de Golgi por la acción de un complejo enzimático formado por una galactosiltransferasa y la  $\alpha$ -lactalbúmina. Probablemente también se forme en esta estructura celular una gran parte de los HMOs presentes en la leche por medio de glicosiltransferasas que se encuentran allí. Precisamente, la secreción de la lactosa determina el movimiento de agua hacia el lumen del alvéolo para mantener la isoosmolaridad en la leche. Las principales proteínas, como las caseínas, se sintetizan en los ribosomas y pasan al interior del retículo endoplasmático rugoso, donde se pliegan; a continuación, son transportadas al aparato de Golgi que lleva a cabo las modificaciones postraduccionales adecuadas (como, por ejemplo, la glicosilación) (Monks y McManaman, 2013).

Todos estos componentes sintetizados y/o modificados en el aparato de Golgi, junto con otras pequeñas moléculas e iones (citrato, fosfato, calcio y agua), se empaquetan en vesículas. Estas vesículas son impermeables a la lactosa que, por ser osmóticamente activa, determina que las vesículas se llenen de agua. Las vesículas se transportan hasta la membrana plasmática apical, a la que se fusionan, liberando el contenido en el espacio luminal del alvéolo (McManaman *et al.*, 2006). Esta fusión se realiza en sitios especializados de la membrana plasmática denominados porosomas (Tripathi *et al.*, 2010). Esta vía es la que se conoce como exocitosis (III, Figura 10).

Algunas proteínas, como la seroalbúmina, las inmunoglobulinas (Ig) y ciertas lipoproteínas, así como otras macromoléculas (factores de crecimiento, citoquinas y hormonas) se transportan intactas a través de las células desde la circulación materna hasta la leche por transcitosis mediante la formación de vesículas (IV, Figura 10). Estas moléculas pasan a través de la membrana basal celular por endocitosis, que puede o no depender de clatrina. Las vesículas formadas se desplazan hasta la membrana apical, aunque en algunas ocasiones pueden fusionarse al aparato de Golgi e, incluso, volver a la membrana basolateral.

Finalmente, durante el embarazo funciona una quinta vía para sustancias y células que se encuentran en la circulación materna, como Igs, macrófagos, neutrófilos, linfocitos B y T, proteínas plasmáticas y micronutrientes como el sodio (Neville, 1998). Es el transporte paracelular, que permite el paso entre las células epiteliales colindantes de los alvéolos, en vez de a su través. Esta vía es operativa durante el embarazo, pero se cierra después del parto mediante zonas de oclusión que se forman entre las células epiteliales cerca de su borde apical y hacen el epitelio impermeable. En la especie humana el cierre completo de estas zonas de oclusión se retrasa unos días después del parto. Por ello, durante este periodo (fase de calostro) pueden pasar distintos elementos de protección del sistema inmunológico y elementos traza esenciales de la madre al lactante (Brandtzaeg, 2013). El descenso de la progesterona poco después del parto induce el cierre de las zonas de oclusión (Neville, 2009). Esto separa una fase donde es más importante la inmunoprotección (calostro) del resto de la lactancia donde, aun siendo importante, predomina la función nutritiva.

El mantenimiento de las zonas de oclusión depende del vaciado del pecho. Cuando no se realiza correctamente, por ejemplo durante el destete y cuando se produce una mastitis, este cierre deja de ser perfecto, permitiendo que algunos componentes de la sangre (como sodio, lactosa, potasio y algunas células del sistema inmunológico) pasen libremente a la leche (Neville, 1999; Hassiotou y Geddes, 2015). De hecho, una elevada concentración en la leche de esos componentes puede ser útil para predecir distintos problemas de la lactancia, como por ejemplo la mastitis (Humenick *et al.*, 1998; Fetherston *et al.*, 2006).

## II.1.7. REGULACIÓN DE LA LACTANCIA

La primera secreción de la glándula mamaria es el calostro, que puede ser de tan solo 5-10 mL el primer día hasta aumentar a unos 120 mL/día en los primeros días posparto. La composición del calostro difiere de la de la leche madura porque es más rico en proteínas, especialmente Igs y lactoferrina, elementos traza y vitamina A (Tablas 1 y 2). Poco a poco la composición de la secreción va cambiando (leche de transición) hasta dar paso a la leche madura. El paso de segregar calostro a segregar leche es lo que se conoce como la “subida” de la leche y ocurre entre el tercer y cuarto día. Durante este periodo, también va aumentando la cantidad de leche que se produce en respuesta a la succión del niño.

Para que la lactancia tenga éxito, además de que se produzca la leche, es necesario que se secrete. El reflejo de eyección es un fenómeno complejo que depende de la activación de una ruta endocrina, que se describe como una sensación de cosquilleo y que se manifiesta con una dilatación de los conductos lactíferos, como se puede observar por ultrasonidos (Ramsay *et al.*, 2004). Cada vez que el niño mama, la estimulación de las terminaciones nerviosas de la areola mamaria dispara un reflejo neuroendocrino (Figura 11). Cuando el núcleo central posterior del hipotálamo recibe



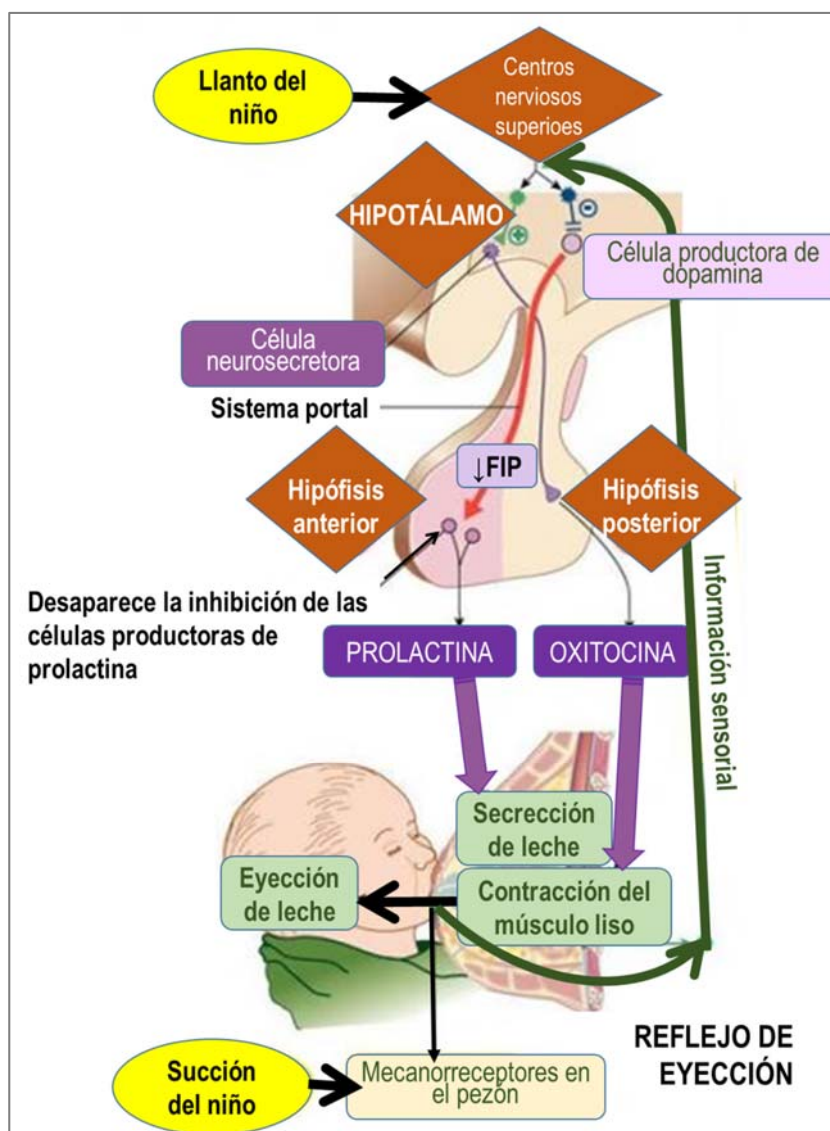
los impulsos nerviosos se induce la rápida liberación de oxitocina (por parte de la hipófisis posterior) al torrente sanguíneo. La oxitocina provoca la contracción de las células mioepiteliales que rodean el alvéolo y, en consecuencia, la eyección de la leche a los ductos terminales. Así, el niño puede obtener la leche con mucha facilidad. Este reflejo también se puede producir por otros medios sensoriales, por ejemplo ver u oír al niño.

Otra hormona crítica para el mantenimiento de la lactancia es la prolactina. Esta hormona no sólo interviene en la preparación de la mama para la producción sino que es vital para estimular la secreción de leche. Los niveles de esta hormona aumentan al final del embarazo y generalmente alcanzan el máximo alrededor del parto. Los estrógenos y la progesterona producidos por la placenta inhiben la secreción de leche durante la lactancia; al disminuir sus niveles tras el parto, la prolactina puede ejercer su efecto estimulador de la secreción de leche.

Los impulsos nerviosos que llegan al cerebro como consecuencia de la estimulación de la areola mamaria también inducen la estimulación de la secreción de prolactina por el lóbulo anterior de la hipófisis (Figura 11). Después de cada toma, los niveles de prolactina aumentan y alcanzan un máximo a los 30-45 minutos después de haberse iniciado la toma y los niveles caen gradualmente en las siguientes horas. Es este aumento de la prolactina el que permite mantener la lactogénesis ya que esta hormona activa la síntesis de leche en las células epiteliales secretoras de los alveolos. A diferencia de la oxitocina, la prolactina solo se produce en respuesta a la succión del niño. El amamantamiento frecuente mantiene los niveles de prolactina circulantes altos, mientras que si la frecuencia es baja se observan oscilaciones muy acusadas. Este efecto es muy importante durante el establecimiento de la lactancia. Con el tiempo, incluso prolongando la lactancia, la concentración de prolactina desciende hasta el nivel que tenía antes del embarazo. En condiciones normales, la producción de leche se puede mantener a niveles adecuados durante varios meses, incluso si el nivel circulante de prolactina es bajo (Lawrence y Lawrence, 2011).

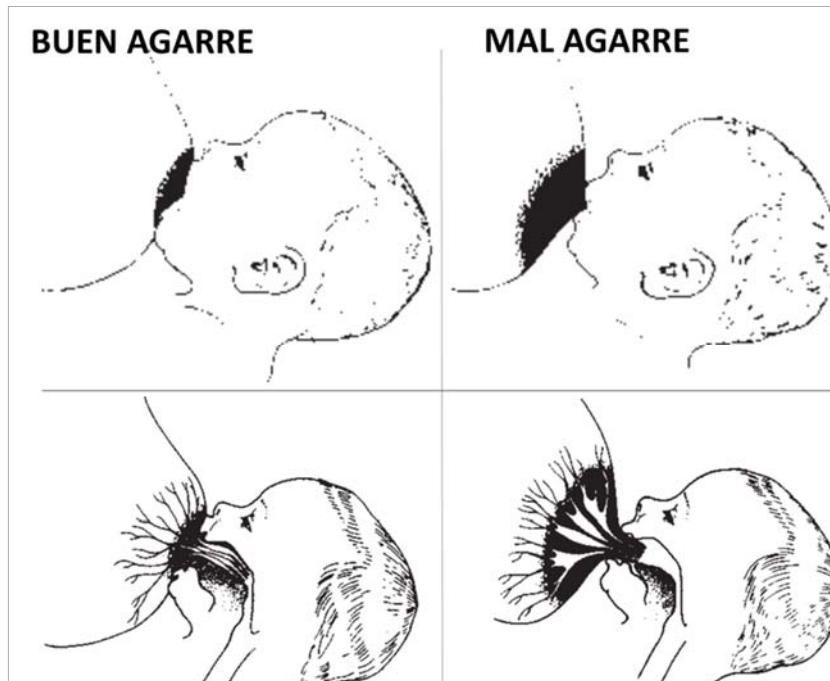
La producción láctea también está regulada por el factor inhibidor de la lactancia, que se encuentra en la leche materna. Si la leche no se extrae, este factor inhibidor se acumula y detiene la secreción por parte de las células secretoras (Wilde *et al.*, 1998). Probablemente sea un mecanismo de protección de la mama. Cuando se extrae la leche, disminuye la concentración del factor inhibidor y se puede reiniciar la secreción de la leche. Esto explica que la cantidad de leche que toma el lactante regule la cantidad de leche producida por la glándula mamaria y es un importante mecanismo de regulación cuando la lactancia está establecida (Lawrence y Lawrence, 2011).

Igualmente, también son importantes los reflejos de búsqueda (cuando algo toca los labios o la mejilla del lactante, se gira y abre la boca, colocando la lengua hacia abajo y hacia adelante), de succión (cuando algo toca su paladar, comienza a



**Figura 11.** Control neuroendocrino del reflejo de eyección de la leche. FIP, Factor inhibidor de la liberación de prolactina.

succionarlo) y de deglución (cuando la boca está llena de leche, la deglute) del lactante. La mayoría de los lactantes pueden lactar a la edad gestacional de 36 semanas, aunque pueden succionar y extraer algo de leche desde la semana 31 (Nyqvist *et al.*, 1999). Para asegurar un buen flujo de leche, el lactante necesita lo que se denomina un “buen agarre” que permita una succión efectiva. El buen agarre se caracteriza porque una gran porción de la areola se encuentra en la boca del lactante, el pecho (no solo el pezón) es traccionado para formar una larga tetilla, la lengua del lactante se encuentra hacia adelante (sobre la encía inferior) y, finalmente, porque el lactante succiona el pecho, pero no el pezón (Figura 12) (OMS, 2010). También es importante para que se produzca un buen agarre que la madre y el lactante estén en una posición apropiada.



**Figura 12.** Signos externos (arriba) y lo que ocurre dentro de la boca del lactante (abajo) cuando se produce buen y mal agarre al pecho. Fuente: OMS (2010).

La mayor parte de los recién nacidos pueden succionar a los 5-10 minutos del nacimiento. Durante los primeros días la mayor parte de los niños demandan la lactancia a intervalos de 2-4 horas, para llegar a una frecuencia de 10-12 tomas diarias al 3°-4° día. Esta elevada frecuencia es un reflejo de la pérdida de peso que se observa durante los primeros días. Cuando el niño comienza a recuperarlo las tomas se espacian a intervalos de unas 3-4 horas. El estímulo provocado por la succión asegura que la madre produzca una cantidad suficiente de leche para las necesidades de su hijo. Precisamente es el apetito del niño el que regula la producción de leche (Daly y Hartmann, 1995a; Daly y Hartmann, 1995b). Sin embargo, la mama no se vacía al final de la toma, sino que suele quedar una cantidad residual (12-20%). Esto indica que el niño se sacia antes de vaciar completamente el pecho. El volumen de leche que ingiere el niño en cada toma depende de su apetito; de este hecho surge la recomendación de la lactancia “a demanda” (Kent *et al.*, 2006). No se ha visto relación entre la ingesta de grasa media diaria y la frecuencia de las tomas (Kent, 2007).

Aunque tampoco hay reglas fijas en relación con la duración de las tomas, deben evitarse las tomas excesivamente cortas porque el reflejo de la prolactina opera algún tiempo después que el reflejo de eyección; si el niño se separa demasiado pronto del pecho, el reflejo será más débil. Por otro lado, las tomas prolongadas y frecuentes pueden ser un signo de succión inefectiva, por lo que se debería revisar el agarre del lactante al pecho para corregir cualquier anomalía.

La glándula mamaria seguirá cumpliendo su función mientras se mantenga la secreción de prolactina y la leche se extraiga de la glándula (Neville *et al.*, 2001). Después del destete, se producirá la apoptosis de una gran proporción de células alveolares y una remodelación de la glándula la devolverá al estado de reposo (Furth, 1999).

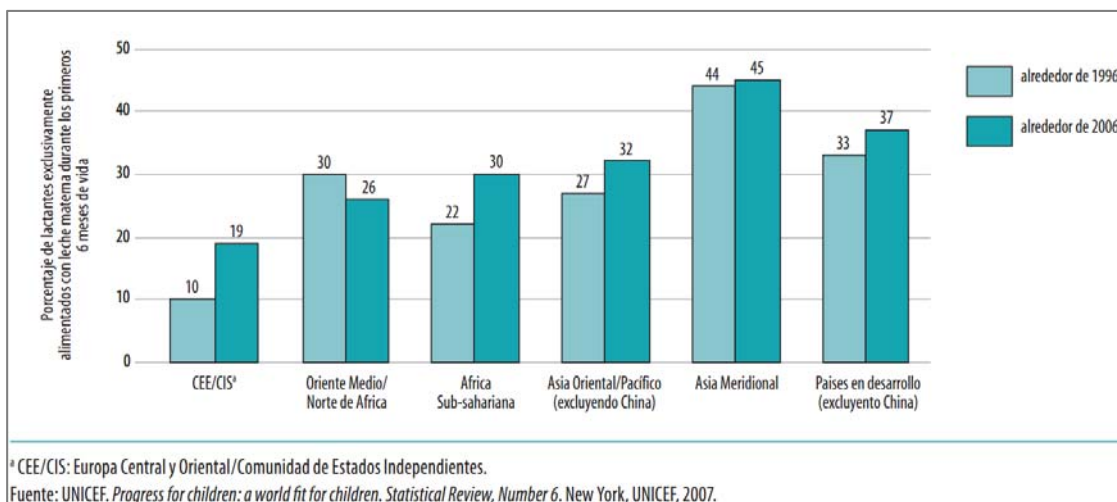
Por último, debe tenerse en cuenta que la lactancia es un proceso natural en las mujeres después del parto pero no es un acto reflejo y requiere entrenamiento. Por ello, es muy importante la implicación del personal sanitario que debe fomentar la decisión de optar por la lactancia materna, permitir que se inicie inmediatamente después del parto, reconocer rápidamente los posibles problemas que surjan y ayudar a resolverlos.

### II.1.8. ASPECTOS SOCIO-CULTURALES DE LA LACTANCIA

La lactancia materna ha tenido una popularidad muy cambiante a lo largo de los siglos. En la literatura histórica hay muchas referencias a la poca conveniencia de dar el calostro e, incluso, la leche materna, a los niños, retrasando el inicio de la lactancia. Tras numerosos altibajos, asociados a distintos motivos sociales, económicos y culturales, puede afirmarse que en los países desarrollados a partir de la década de los 70 hay una clara tendencia a potenciar la lactancia materna (OMS, 2010) (Figura 13).

En el año 2002, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y UNICEF adoptaron la denominada *Estrategia mundial para la alimentación del lactante y del niño pequeño* (WHO/UNICEF, 2003). El objetivo era revitalizar la atención sobre el impacto de las prácticas de alimentación en la nutrición, crecimiento, desarrollo, salud y sobrevivencia de los niños. Para ello recomendaron la lactancia materna exclusiva durante los seis primeros meses de vida del niño y ampliaron la recomendación hasta el primer o segundo año de vida, o hasta que la pareja madre-hijo lo deseen, introduciendo la alimentación complementaria a los seis meses de edad. A estas recomendaciones se suman diversas organizaciones internacionales y nacionales, como los Comités de Lactancia Materna (CLM) de la Academia Americana de Pediatría (AAP) o de la Asociación Española de Pediatría (AEP) (AAP-*Section on Breastfeeding*, 2012; AEP-Comité de Lactancia Materna, 2012).

Entre los años 1996 y 2006, la tasa de lactancia materna exclusiva durante los primeros seis meses ha pasado del 33 al 37% a nivel mundial (OMS, 2010). En Europa y el África subsahariana el aumento ha sido del 10 al 19% y del 22 al 30%, respectivamente. Es probable que este incremento está relacionado con la divulgación de los numerosos beneficios que se asocian a la lactancia materna. Lamentablemente, a nivel mundial, la práctica deficiente o inadecuada de la lactancia materna todavía está muy difundida debido a factores sociales, culturales, sanitarios y comerciales, a lo que se debe sumar el desconocimiento sobre la lactancia (Tabla 4).



**Figura 13.** Tendencia de la tasa de lactancia materna exclusiva entre los años 1996 y 2006. Fuente: OMS (2010).

Se estima que tan sólo el 38% de los lactantes recibe lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses de vida, lo cual se asocia con más de 800.000 muertes infantiles a nivel mundial en el año 2011 (WHO, 2009). En España, la duración media de la lactancia materna, incluyendo la exclusiva y la mixta, fue de 3,2 meses en 1997 (AEP-Comité de Lactancia Materna, 1999). Los datos más recientes disponibles (recopilados en 2012) indican que la prevalencia de la lactancia materna exclusiva ha aumentado notablemente, sobre todo a los 3 y 6 meses, aunque no se llega a alcanzar el nivel medio a nivel mundial (Tabla 5). En otros países europeos se observa una tendencia similar, con un nivel de iniciación de lactancia muy elevado, pero sin observar la exclusividad ni prolongarse durante el tiempo recomendado (Rouw *et al.*, 2015).

En ese estudio realizado en España, los factores identificados con una relación más directa con una corta duración de la lactancia materna fueron una edad gestacional menor de 37 semanas, el nacimiento por cesárea, un peso al nacer inferior a 2,5 kg, padres con un nivel de estudios bajo y una edad de la madre inferior a 25 años (AEP-Comité de Lactancia Materna, 1999). Es probable que las campañas de promoción por parte de los profesionales y de los grupos de apoyo de la lactancia que han proliferado en los últimos años hayan participado y sigan colaborando en la prolongación de esta práctica.

La OMS tiene como objetivo aumentar la tasa de lactancia materna exclusiva al menos al 50%. Entre las principales estrategias propuestas para conseguirlo se encuentran: a) limitar la propaganda sobre las fórmulas infantiles, b) apoyar las bajas maternales retribuidas, c) reforzar los sistemas sanitarios para que apoyen la

**Tabla 4.** Principales factores que contribuyen a las bajas tasas de lactancia materna exclusiva a nivel mundial

- ✓ Creencias que favorecen la lactancia mixta (por ejemplo, que los lactantes necesitan líquidos o sólidos adicionales antes de los 6 meses)
- ✓ Prácticas hospitalarias o sanitarias incorrectas
- ✓ Falta de asistencia especializada (en centros sanitarios)
- ✓ Publicidad agresiva sobre fórmulas infantiles, leche en polvo y otros sustitutos de la leche materna
- ✓ Legislación inadecuada en relación con las bajas maternales o paternales o los permisos para lactancia
- ✓ Desconocimiento de los peligros de la no adhesión a la lactancia materna exclusiva y de las técnicas de lactancia apropiadas

Fuente: WHO (2015)

**Tabla 5.** Resultados de la Encuesta Nacional de Salud para la lactancia materna

TIPO DE LACTANCIA	1995 (%) <sup>a</sup>	1997 (%) <sup>a</sup>	2012 (%) <sup>b</sup>
<b>6 semanas</b>			
Exclusiva	60,5	65,5	66,2
Mixta	10,4	10,4	6,2
Artificial	28,0	23,6	27,6
<b>3 meses</b>			
Exclusiva	37,4	43,8	53,6
Mixta	16,8	14,3	13,0
Artificial	44,7	41,0	33,5
<b>6 meses</b>			
Exclusiva	15,1	21,2	28,5
Mixta	17,5	13,8	18,4
Artificial	65,6	64,1	53,1

Fuente: <sup>a</sup>Asociación Española de Pediatría-Comité de Lactancia Materna (1999); <sup>b</sup>Encuesta Nacional de Salud 2011-2012 (INE-MSSSI)

lactancia materna exclusiva, incluyendo el acercamiento a los criterios de la *Iniciativa para la Humanización de la Asistencia al Nacimiento y la Lactancia* (IHAN), y d) proporcionar estrategias de apoyo comunitario para el asesoramiento de las mujeres

embarazadas y lactantes (WHO, 2015). En España, las recomendaciones para promover la lactancia materna elaboradas por el Comité de Lactancia de la Asociación Española de Pediatría se recogen en un documento publicado en 2012 (AEP-Comité de Lactancia Materna, 2012).

Numerosos estudios han confirmado la relación existente entre la lactancia materna y la educación, clase social, relación estable y otros factores demográficos (Tabla 6). En general, la educación y una pareja estable favorecen la lactancia materna, mientras que el trabajo asalariado de la mujer fuera de casa y la pertenencia a algunas etnias no son factores favorables. Significativamente, la alimentación con fórmulas infantiles todavía es la predominante entre las mujeres de clases sociales bajas en áreas deprimidas en algunos países (Lawrence y Lawrence, 2011).

**Tabla 6.** Tasas de lactancia materna exclusiva a los 6 meses en función de los ingresos familiares a nivel mundial

<b>Grupo según nivel socioeconómico</b>	<b>Lactancia materna exclusiva (%)</b>
Ingresos bajos	32,1
Ingresos medios-bajo	40,8
Ingresos medios-alto	29,1
Ingresos altos	12,1
Global	34,8

Fuente: WHO (2009).

## II.1.9. BENEFICIOS ASOCIADOS A LA LACTANCIA MATERNA

Desde hace tiempo se ha considerado que la lactancia materna es una estrategia preventiva y de muy bajo coste para mejorar la salud materna e infantil tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo (Ip *et al.*, 2007; Fall *et al.*, 2011). Una revisión sistemática y un metaanálisis realizado en 2007 sobre los beneficios de la lactancia materna en la salud de la pareja madre-hijo concluyó que esta práctica reducía, en el niño, el síndrome de muerte súbita, las infecciones gastrointestinales, las enfermedades respiratorias (tracto superior e inferior) y las hospitalizaciones relacionadas con afecciones respiratorias, la leucemia infantil, el asma, las infecciones de oído, la obesidad infantil y el riesgo de sufrir diabetes mellitus tipo II, y, en la madre, el riesgo de cáncer de ovario y mama (Ip *et al.*, 2007).

Además, todos estos beneficios derivados de la lactancia tienen un gran impacto económico. Se ha estimado, por ejemplo, que si el 90% de las familias americanas

siguiesen la recomendación actual de completar la lactancia materna exclusiva durante los primeros 6 meses de vida de los niños se ahorrarían 13.000 millones de dólares americanos al año y, lo que es más importante, 911 muertes, de las cuales la mayoría serían de niños (Bartick y Reinhold, 2010). Por ello, se ha propuesto que, aunque en estos momentos la lactancia materna y la leche humana son invisibles a la economía, deberían incluirse como parte del producto interior bruto de los países (Smith, 2013). Su gran relevancia debería tenerse en cuenta para desarrollar programas de promoción y soporte de la lactancia durante un tiempo adecuado.

La lactancia materna no solo determina un menor gasto familiar y sanitario (se reducen las visitas médicas, el consumo de medicamentos y los ingresos hospitalarios) y absentismo laboral en los padres, sino también menor gasto energético (fabricación, transporte y preparación de fórmulas infantiles y utensilios) y menor impacto medioambiental (transporte y residuos de envases).

#### **II.1.9.1. Beneficios para el lactante**

La leche humana contiene numerosos compuestos con actividad biológica que prolongan la funcionalidad de la leche más allá de proporcionar los nutrientes esenciales y la energía (Tabla 3). Estos compuestos parecen facilitar la transición del niño desde la vida intrauterina a la extrauterina. En este sentido, la leche materna proporciona al lactante protección inmunológica y contribuye a la regulación de su crecimiento, desarrollo y metabolismo.

##### **II.1.9.1.1. Aspectos nutritivos**

En las últimas décadas se ha hecho un gran esfuerzo para obtener información científica detallada sobre la composición en macro- y micronutrientes de la leche materna. Esto entraña una gran dificultad porque dicha composición varía con la etapa de la lactancia, el momento del día, el momento en que se toma la muestra en una misma toma y, por supuesto, con el individuo.

A medida que se dispone de más datos, se confirma que la composición de la leche materna es la más adecuada para cubrir las necesidades del recién nacido, fruto de millones de años de evolución, adaptando su composición a las necesidades de cada individuo (Andreas *et al.*, 2015). Así, por ejemplo, el calostro producido durante los primeros días difiere notablemente en composición, tanto en términos cuali- como cuantitativos, de la leche de transición (producida durante los primeros cuatro a diez días) y de la leche madura (Tablas 1 y 2). El calostro contiene menos grasa, cuya función es sobre todo nutritiva, y más proteínas (en particular, Igs), HMOs y antioxidantes, que tienen una función protectora (Lawrence y Lawrence, 2011). De forma similar, la composición del calostro y la leche producidos por madres que han tenido un hijo prematuro difiere de los de aquellas madres cuyos hijos han nacido a



término y, además, varía con el tiempo (Espinosa-Martos *et al.*, 2013; Moles *et al.*, 2015).

Probablemente esta idoneidad se debe no solo a su compleja composición en nutrientes, sino también al intrincado balance en el que se encuentran y a su elevada biodisponibilidad. Es más, algunos componentes potencian la absorción de otros. Éste es el caso de la lactoferrina, que permite la completa absorción de las pequeñas concentraciones de hierro que hay en la leche materna, y de algunas enzimas que colaboran en la digestión y absorción, como por ejemplo la amilasa y la lipasa (Lawrence y Lawrence, 2011). Esto, además, pone de manifiesto que algunos componentes de la leche humana pueden tener múltiples papeles; la lactoferrina, por ejemplo, contribuye a la absorción de hierro (función nutritiva) y también tiene actividad antimicrobiana (función protectora), como se indicará a continuación.

Es sabido que existen diferencias en el patrón de crecimiento (talla y peso) de los niños alimentados con leche materna y con fórmula, e incluso en el de los alimentados con lactancia materna durante un periodo de tiempo corto o largo. Estas diferencias no se manifiestan en las primeras 6-8 semanas de vida, sino a partir de los 6 meses de edad. Los niños alimentados con fórmula tienen mayor ganancia en peso y talla probablemente debido a una mayor ingesta de proteína asociada a la composición constante de las fórmulas infantiles, frente a la reducción progresiva del contenido proteico que se observa en la leche materna a lo largo del tiempo (Ziegler, 2006; Mahrshahi *et al.*, 2011). Este rápido crecimiento del niño en el primer año de vida se ha asociado con un mayor riesgo de sobrepeso y obesidad en etapas posteriores (Ong y Loos, 2006; Koletzko *et al.*, 2009). La introducción temprana de alimentos sólidos parece aumentar aún más el riesgo de tener un elevado índice de masa corporal entre los niños alimentados con fórmula (Imai *et al.*, 2014).

La composición de la leche humana también está concebida para el óptimo desarrollo del cerebro. El cerebro humano es el de mayor tamaño cuando se compara con el de otras especies de talla similar; su formación y mantenimiento requiere el aporte a través de la dieta de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y, en particular, de ácido docosahexanoico (DHA, del inglés *docosahexaenoic acid*), dada la limitada capacidad biosintética para este compuesto de la especie humana (Brenna y Carlson, 2014). La leche humana proporciona cantidades substanciales de este tipo de ácidos grasos que son fundamentales para el desarrollo del cerebro y la retina (Brenna *et al.*, 2007). De hecho, desde hace algunos años se recomienda la complementación de las fórmulas infantiles con DHA y ácido araquidónico (AA) ante la evidencia de que la agudeza visual y el desarrollo cognitivo son mejores en los niños alimentados con leche materna gracias a la presencia de estos ácidos (Fleith y Clandinin, 2005).

Es imposible hacer aquí una descripción detallada de los beneficios asociados a todos los componentes de la leche materna. Sin embargo, y a modo de ejemplo, se

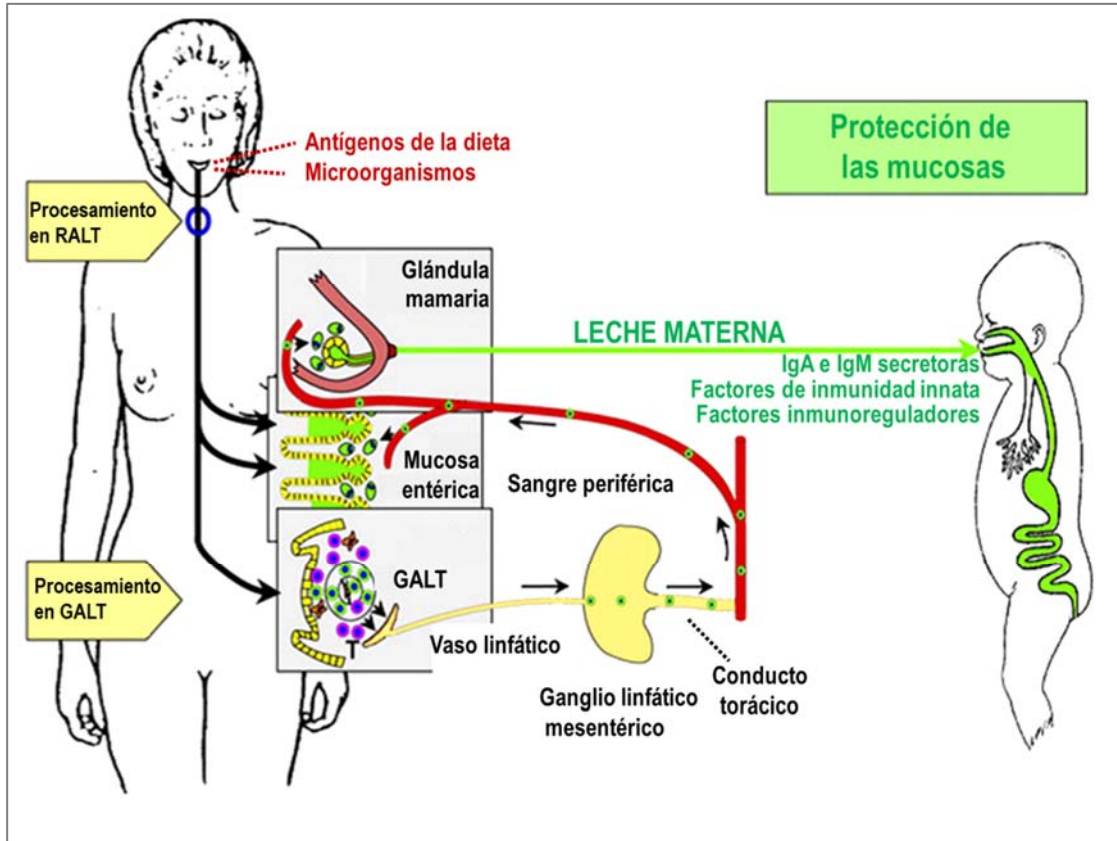
mencionarán algunos cuya importancia biológica ha determinado que las fórmulas infantiles se deban complementar con ellos: la colina, la L-carnitina y los nucleótidos (Koletzko *et al.*, 2013). La colina es una amina implicada en la integridad estructural de las membranas celulares, la metilación, la señalización transmembrana, el transporte y metabolismo de lípidos y el normal desarrollo del cerebro (Davenport y Caudill, 2013). La L-carnitina es una amina cuaternaria esencial para el catabolismo mitocondrial de los ácidos grasos de cadena larga y el recién nacido requiere un aporte exógeno con la alimentación después del nacimiento. Durante la transición a la vida extrauterina, la L-carnitina es vital para el metabolismo que los ácidos grasos derivados de la grasa de la leche y de los depósitos endógenos de grasa, que son la fuente energética preferida para el corazón, el cerebro y otros tejidos con una elevada demanda energética (Kepka *et al.*, 2014). Por su parte, los nucleótidos intervienen en múltiples procesos celulares (regulan actividades enzimáticas, actúan como mediadores metabólicos) y, por ello, son indispensables para el desarrollo, maduración y reparación del tracto gastrointestinal, el desarrollo de la microbiota y el funcionamiento del sistema inmunológico (Wu y Chen, 2013). No se ha establecido la necesidad de añadir taurina a las fórmulas infantiles, a pesar de ser el aminoácido libre más abundante presente en la leche humana (Koletzko *et al.*, 2013).

#### ***II.1.9.1.2. Protección frente a infecciones***

La lactancia materna se ha relacionado desde muy antiguo con la protección del lactante frente a infecciones. Una de las primeras observaciones del efecto protector de la leche materna se publicó en la literatura médica en 1892 y se relacionó con la presencia de una sustancia que precipitaba con sulfato amónico, que se denominó anticuerpo (Wheeler *et al.*, 2007). Actualmente se sabe que la leche humana contiene numerosos factores bioactivos implicados en los mecanismos de defensa de la glándula mamaria que, al mismo tiempo, complementan y estimulan el desarrollo del sistema inmunológico del niño (Figura 14).

Esta protección frente a infecciones es un fenómeno que se demuestra con mucha facilidad en aquellas sociedades que viven en condiciones sanitarias deficientes, pero también es patente en sociedades más avanzadas. Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos proporcionan una evidencia contundente sobre el efecto protector de la leche materna frente a infecciones gastrointestinales y respiratorias, que son la principal causa de morbilidad en niños (Kramer *et al.*, 2001; Quigley *et al.*, 2007; Duijts *et al.*, 2010). En la Tabla 7 se muestra la revisión hecha por la Academia Americana de Pediatría del informe preparado por la *Agency for Healthcare Research and Quality* de los EEUU, en el que se ha revisado y analizado de manera exhaustiva la literatura científica publicada hasta ese momento comparando el efecto de la alimentación (leche materna o leche de fórmula) en la salud de los niños (Ip *et al.*, 2007; AAP-Section on Breastfeeding, 2012). Los datos presentados en esa tabla hacen

referencia, además, a que existe una relación dosis-respuesta entre la duración de la lactancia y su efecto protector.



**Figura 14.** Transferencia de inmunidad de la madre al lactante. RALT: tejido linfático asociado a la mucosa respiratoria; GALT: tejido linfático asociado a la mucosa intestinal. Adaptado de Brandtzaeg (2013).

La enterocolitis necrotizante (NEC) es la principal causa de morbilidad y mortalidad en los niños prematuros. El riesgo de sufrir esa enfermedad (3-12%) y la mortalidad asociada (16-42%) tienen una estrecha relación con el peso al nacer (Fitzgibbons *et al.*, 2009). En estos niños, la alimentación con leche materna exclusiva es especialmente relevante porque determina una reducción en la incidencia de NEC que oscila entre el 58 y el 77% (AAP-*Section on Breastfeeding*, 2012). Este efecto se ha atribuido a la presencia en la leche materna de una gran variedad de compuestos que modifican la inmunidad, la inflamación y la protección de las mucosas del prematuro, pero no se ha podido identificar ningún componente en particular (Sullivan *et al.*, 2010).

**Tabla 7.** Ventajas asociadas a la lactancia materna

<b>Enfermedad</b>	<b>Aumento del riesgo (%)</b>
<b>Nacidos a término</b>	
Infección aguda de oído (otitis media)	100
Eczema (dermatitis atópica)	47
Diarrea y vómitos (infección gastrointestinal)	178
Hospitalización por infección de las vías respiratorias inferiores en el 1 <sup>er</sup> año	257
Asma (con antecedentes familiares)	67
Asma (sin antecedentes familiares)	35
Obesidad infantil	32
Diabetes mellitus tipo 2	64
Leucemia linfocítica aguda	23
Leucemia mieloide aguda	18
Síndrome de muerte súbita infantil	56
<b>Prematuros</b>	
Enterocolitis necrotizante	138
<b>Madres</b>	
Cáncer de mama	4
Cáncer de ovario	27

Fuente: *U.S. Department of Health and Human Services* (2011)

Entre los compuestos de la leche materna relacionados con la protección frente a enfermedades infecciosas se encuentran distintos tipos de leucocitos, anticuerpos específicos, citoquinas, nucleótidos y numerosos elementos del sistema de defensa innato (lactoferrina, lisozima, lactoperoxidasa, HMOs, ácidos grasos...) como se indica en la Tabla 8 (Wheeler *et al.*, 2007; Brandtzaeg, 2013). Uno de los factores más importantes y estudiados es la Ig A secretora (IgAs), cuya concentración es especialmente abundante en el calostro y la leche producida los primeros días. La protección que ofrece la IgAs en el intestino del recién nacido se debe a varias acciones, entre las que cabe mencionar la neutralización intracelular y excreción de partículas víricas, la exclusión inmunológica (consistente en impedir la unión de un patógeno a una superficie mucosa), la aglutinación de bacterias y virus y la interferencia con la movilidad bacteriana (van Egmond *et al.*, 2001).

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGB- $\beta$ , del inglés *Transforming Growth Factor*  $\beta$ ) que se encuentra en la leche es miembro de una familia de factores de crecimiento que interviene en el desarrollo inmunológico del lactante. Entre otras funciones, el TGB- $\beta$  participa en el mantenimiento de la homeostasis en el intestino, la

regulación de la inflamación y el desarrollo de alergias, así como en el desarrollo de la tolerancia oral (Oddy, 2013). Es decir, es fundamental para que el niño tenga unas respuestas inmunológicas apropiadas. En concreto, parece haber una estrecha relación entre la concentración de la isoforma TGB- $\beta$ 1 en el calostro humano y las respuestas inmunológicas que reducen la probabilidad de que el niño desarrolle alergia a las proteínas de la leche de vaca (Oddy y Rosales, 2010). Sin embargo, la isoforma más abundante en la leche materna es TGB- $\beta$ 2, aunque la mayor parte está presente de forma latente. El paso a través del estómago infantil (acidez) provoca su activación. Dado que la mucosa del intestino del lactante es permeable durante la primera semana de vida, el paso de esta citoquina activa se facilitaría en este momento, cuando su concentración en la leche es muy elevada; de esta forma podría activar órganos extraintestinales (Oddy, 2013).

**Tabla 8.** Principales factores de la leche materna implicados en la protección frente a infecciones

<b>Factores solubles</b>	Inmunoglobulinas	IgAs (11S) IgA (7S) IgG IgM IgE IgD
	Citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento	TGF- $\beta$ 2
	Otros factores	Lactoferrina, lactoferricina Lisozima Péptidos antimicrobianos $\alpha$ -Lactalbúmina (HAMLET) Lactoperoxidasa Xantina oxidoreductasa Complemento HMOs, glicanos Lípidos y ácidos grasos
<b>Factores celulares</b>	Células del sistema inmunológico y otras células eucariotas	Linfocitos T Linfocitos B Neutrófilos Macrófagos Células epiteliales Células madre
	Bacterias comensales	

Fuente: Adaptado de Brandtzaeg (2013).

Otro componente de la leche materna con un importante impacto en la protección frente a infecciones, cuyo estudio en profundidad se ha abordado en los últimos años, es la fracción de los HMOs. A diferencia de otras especies animales, la leche y, sobre todo, el calostro humanos son ricos en este tipo de compuestos, constituyendo el tercer componente en abundancia de este fluido biológico; el calostro humano contiene 22–24 g/L de HMOs, mientras que en el bovino sólo hay 1 g/L, y la leche humana madura 12–14 g/L (Kunz *et al.*, 2000). La función más importante de estos HMOs es la de contribuir a la protección frente a infecciones del tracto gastrointestinal, como componentes del sistema de defensa innato. Muchos patógenos inician la infección tras una primera etapa de adhesión al glicocáliz del epitelio del hospedador. Curiosamente, la estructura de estos HMOs imita la de esos receptores, lo que les permite actuar como ligandos solubles que bloquean la unión de virus, bacterias y protozoos (Bode, 2015).

Ése es el mismo modo de acción de MUC1, la principal glicoproteína presente en la leche humana que está ausente en la de otras especies animales. MUC1 se une al dominio DC-SIGN, que reconoce distintos glicanos (como los de la superficie de virus, bacterias y protozoos) y se expresa en las células dendríticas que se localizan a lo largo de todo el tracto gastrointestinal en lactantes. Esta unión, como se ha indicado anteriormente, bloquea la interacción de los patógenos (Koning *et al.*, 2015). Por otra parte, los HMOs también tienen actividad antimicrobiana, actuando como bacteriostáticos o bactericidas, y alteran la respuesta del epitelio del hospedador y de las células del sistema inmunológico (Bode, 2015).

### ***II.1.9.1.3. Protección frente a otras enfermedades***

Algunos estudios epidemiológicos recientes indican que el riesgo de síndrome metabólico, sobrepeso y obesidad en los niños disminuye con la lactancia materna (Tabla 7) (Aguilar-Cordero *et al.*, 2015). Este efecto no sólo es evidente en los primeros meses de vida, sino que sigue siendo patente en etapas posteriores; el beneficio obtenido es dependiente de la duración de la lactancia (Gillman *et al.*, 2001). Así, por ejemplo, el índice de masa corporal a los 6 años es superior ( $1,1 \text{ kg/cm}^2$ ) en los niños alimentados con fórmula (y con introducción temprana de alimentos sólidos) que los que recibieron lactancia materna (Imai *et al.*, 2014).

Una posible explicación es la diferencia en la ingesta de proteínas (como se ha comentado en el apartado II.1.1.1), en la distinta respuesta hormonal a la alimentación (mayor respuesta insulínica con las fórmulas infantiles) o en las preferencias dietéticas (Horta y Victora, 2013).

Las evidencias disponibles actualmente indican que la lactancia tiene un efecto protector frente a la diabetes de tipo 2, en especial entre los adolescentes (Horta *et al.*, 2015). Parte de este efecto está asociado al menor sobrepeso y obesidad, aunque los

datos disponibles no son concluyentes. También podrían contribuir otros dos aspectos relacionados con la lactancia, ya comentados: la mayor presencia de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (en especial, DHA y ácido araquidónico) en la leche materna y las diferencias en la secreción de insulina dependiendo del tipo de alimentación (Horta y Victora, 2013).

De forma similar, la lactancia parece influir notablemente en otras enfermedades que se desarrollan en la edad adulta, como las enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Cada vez es más evidente que la primera etapa de la vida de un individuo es crítica para su posterior desarrollo y que su perturbación se asocia con una programación metabólica anormal (Patti, 2013). En este sentido, por ejemplo, la duración de la lactancia tiene una marcada influencia en la metilación del gen que codifica la leptina y, en consecuencia, en su expresión y en la concentración de leptina (Obermann-Borst *et al.*, 2013). La leptina es una hormona que, entre otras funciones, regula la ingesta de alimentos y la expresión de péptidos que controlan el gasto energético. Por ello, se ha sugerido que este efecto epigenético de la lactancia (metilación del gen de la leptina) podría explicar el efecto protector de la lactancia frente a la obesidad y enfermedades relacionadas (alta presión arterial, niveles de lípidos séricos...) (Wijnands *et al.*, 2015).

También hay indicios de una relación entre la lactancia materna y la reducción del riesgo de enfermedades autoinmunes y alérgicas (enfermedad celíaca, alergia, asma, atopia, eccema, enfermedades inflamatorias intestinales...) (Ip *et al.*, 2007; Donovan, 2008) (Tabla 7). Estas alteraciones suelen estar ligadas a un sistema inmunológico hiperactivado que ataca dianas ambientales inofensivas o al propio individuo. El adecuado desarrollo del sistema inmunológico depende en gran medida de la colonización intestinal del recién nacido y esto, a su vez, del tipo de alimentación. La leche materna, además de HMOs, que promueven el crecimiento de una microbiota intestinal adecuada, posee una microbiota comensal propia que contribuye a la colonización intestinal del niño (Fernández *et al.*, 2013). Además, la lactancia materna también previene la exposición a estímulos que, en ese momento de la vida del niño, dispararían una respuesta inmunológica inapropiada. No obstante, en el desarrollo de estas enfermedades autoinmunes también interviene la predisposición genética del individuo (Richard-Miceli y Criswell, 2012).

El riesgo de muerte súbita infantil, una de las principales causas de muerte neonatal en los países desarrollados, es menor en los niños alimentados con lactancia materna que en los alimentados con fórmula, siendo el efecto mayor si la lactancia materna es exclusiva (Ip *et al.*, 2007; Hauck *et al.*, 2011) (Tabla 7). Se desconoce el motivo exacto, aunque se ha atribuido a que los niños con lactancia materna se despiertan con más facilidad que los alimentados con fórmula o a que están más protegidos frente a las infecciones. Aunque, por otra parte, recientemente se ha observado que el uso del chupete también reducía el riesgo de muerte súbita (Alm *et*

*al.*, 2015). A pesar de ello, en las campañas para reducir la muerte súbita del lactante se suele recomendar la lactancia materna (Dieterich *et al.*, 2013).

#### **II.1.9.1.4. Beneficios cognitivos**

La relación entre la lactancia materna y el desarrollo cognitivo ha sido objeto de numerosos estudios desde las primeras observaciones realizadas por Hoefler y Hardy (1929) al comparar niños que habían sido alimentados con leche materna o con fórmulas infantiles. Desafortunadamente, los resultados obtenidos hasta la fecha son contradictorios. Se suele afirmar que los niños que han recibido leche materna son más inteligentes, pero no hay acuerdo en que esto sea una relación causal directa o simplemente una asociación debida al coeficiente de inteligencia y la clase socioeconómica de los padres. Como ya se ha comentado, es posible que exista una relación directa con los ácidos grasos insaturados (presentes en la leche materna y ausentes en las fórmulas infantiles).

La explicación más probable a los resultados tan dispares que se obtienen al evaluar el efecto de la lactancia materna en la inteligencia de los niños es la dificultad de controlar todos los posibles factores de confusión que pueden afectar al desarrollo del niño. Y, evidentemente, por razones éticas, no es posible realizar ensayos clínicos controlados aleatorizados. Un metaanálisis realizado en 2002 concluyó que la mayoría de los estudios existentes hasta ese momento apoyaban la hipótesis de que la alimentación con leche materna promovía la inteligencia de los niños, pero no tuvieron en cuenta los factores de confusión (Jain *et al.*, 2002).

Los resultados de un metaanálisis más reciente parecen indicar que el principal efecto de la lactancia sobre la capacidad cognitiva de los niños se debe al coeficiente de inteligencia y nivel socioeconómico de la madre (Walfisch *et al.*, 2013). Cuando se tienen en cuenta esos factores de confusión, se observa que las niñas que han recibido lactancia materna tienen una ligera ventaja cognitiva en los primeros meses de vida, aunque el efecto es muy leve y, además, no se observa en los niños. Por otra parte, parece que la lactancia no tiene un impacto positivo a largo plazo (en la adolescencia) ni en los niños ni en las niñas (von Stumm y Plomin, 2015). En cambio, otro metaanálisis concluye que los niños alimentados con leche materna tienen mejores resultados en los test de inteligencia (Horta *et al.*, 2015). En definitiva, la lactancia materna parece tener un beneficio a corto plazo en el desarrollo cognitivo del niño, pero es difícil asegurar categóricamente que ese beneficio se mantiene a largo plazo.

#### **II.1.9.2. Beneficios para la madre**

A menudo se señala que las mujeres lactantes tienen una recuperación más rápida en el puerperio porque tienen menos pérdidas de sangre posparto y una



involución más rápida del útero. La oxitocina liberada durante el amamantamiento estimula la contracción e involución del útero, con lo cual éste retorna al estado que tenía antes del embarazo en unas seis semanas.

Además, la producción de leche emplea los depósitos energéticos acumulados durante el embarazo, lo cual podría contribuir a la pérdida de peso que habitualmente se asocia con la lactancia. Sin embargo, no existen datos concluyentes sobre la relación entre la lactancia y una mayor pérdida del peso ganado durante el embarazo, probablemente por la gran cantidad de factores de confusión que existen (dieta, actividad física, índice de masa corporal previo y raza, entre otros) (Chowdhury *et al.*, 2015b).

La lactancia revierte algunos cambios que se producen durante el embarazo para favorecer el desarrollo del feto, como por ejemplo los cambios en el metabolismo lipídico y el de la glucosa relacionados con un estado hiperlipidémico y la resistencia a la insulina. Es más, los cambios favorables asociados a la lactancia parecen persistir tras el destete y podrían estar relacionados con el menor riesgo de padecer ciertas enfermedades crónicas a largo plazo como diabetes de tipo 2, hipertensión o enfermedad cardiovascular (Dieterich *et al.*, 2013).

Algunos investigadores han señalado que el riesgo de osteoporosis en etapas posteriores de la vida es mayor en mujeres que no han tenido hijos, algo menor en aquellas que sí han tenido y bastante menor en aquellas que, además, los han amamantado. Sin embargo, una reciente revisión sistemática y un metaanálisis realizado para evaluar el efecto de la lactancia en la salud de la madre no confirma la existencia de una relación con la densidad mineral del hueso (Chowdhury *et al.*, 2015b). El embarazo y la lactancia provocan un gran cambio en el metabolismo del calcio y el hueso en la mujer pero las pérdidas de densidad ósea son solo temporales y a los 19 meses posparto se recuperan los valores existentes antes del embarazo, independientemente de la duración de la lactancia (Møller *et al.*, 2011).

La lactancia materna prolongada más allá de 12 meses reduce el riesgo de cáncer de mama y ovario en un 26 y un 37%, respectivamente, según los datos derivados de un metaanálisis reciente (Chowdhury *et al.*, 2015b). Además, las mujeres que no han amamantado nunca tienen un riesgo de 2,4 y 1,3 veces mayor que aquellas que lo han hecho en alguna ocasión, sin tener en cuenta la duración de la lactancia (Stuebe, 2009). En concreto, cada año de lactancia parece estar asociado a una reducción del 4,3% en el riesgo de cáncer de mama invasivo (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*, 2002).

Finalmente, el vínculo que se establece entre la madre y su hijo lactante es uno de los más fuertes que establece el ser humano. Es indudable que de este vínculo derivan un gran número de beneficios psicológicos para la madre, como por ejemplo una mayor autoestima y seguridad.

### II.1.9.3. Contraindicaciones médicas para la lactancia

Aunque casi todas las madres pueden amamantar a sus hijos, existen ciertas ocasiones en que es necesario sopesar los beneficios y los riesgos de la lactancia para una determinada pareja madre-hijo. En esos casos se justificaría el empleo de leche donada y, en caso de no haber disponibilidad, de fórmulas infantiles adecuadas, bien de manera temporal o permanente (Asamblea Mundial de la Salud, 1986).

En primer lugar y en relación con enfermedades infecciosas de la madre, no hay contraindicación para la lactancia si dicha infección está controlada y tratada de forma adecuada. Este sería el caso de infecciones respiratorias, gastrointestinales o genitourinarias, a no ser que deriven en septicemia. Es probable que aunque el niño haya estado expuesto al agente infeccioso, también reciba los anticuerpos y otros factores de resistencia de la madre a través de la leche materna (Figura 14).

Sin embargo, existen dos casos, al menos, en los que se suele recomendar evitar la lactancia. El primero es en caso de infección con el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) porque la leche materna es una vía de transmisión. Por este motivo, en los países desarrollados se insta a las madres infectadas con el VIH a evitar la lactancia materna y sustituirla por una fórmula infantil (McGowan y Shah, 2000). No obstante, la situación podría cambiar en los próximos años.

Sin embargo, en los países en vías de desarrollo, la lactancia materna en madres positivas para el VIH sólo se desaconseja por completo cuando la alimentación de sustitución con fórmulas infantiles es aceptable, factible, asequible, sostenible y segura (criterios AFASS) (WHO, 2007). En caso contrario y en esta situación, que suele ser lo más habitual en el África subsahariana, se recomienda la lactancia materna exclusiva durante los primeros seis meses, porque la leche materna no sólo les proporciona protección frente al VIH sino también frente a otras infecciones, además de una correcta nutrición (AAP-*Section on Breastfeeding*, 2012). De hecho, los lactantes de zonas endémicas para el VIH que son amamantados durante los 3 primeros meses y no reciben complementos alimenticios tienen un menor riesgo de infectarse que los que reciben fórmulas comerciales o tienen una lactancia mixta (Horvath *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando se prolonga el tiempo de lactancia, especialmente cuando se introducen otros alimentos, aumenta el riesgo de transmisión del virus, aunque sigue disminuyendo la mortalidad en comparación con las fórmulas infantiles. Esta protección que proporciona la leche materna está relacionada con su actividad inhibidora frente al VIH, incluso cuando la leche se ha obtenido de madres VIH positivas (Wahl *et al.*, 2015), que determina que la mayor parte de los hijos de madres infectadas con el VIH no se infecten durante la lactancia. En estos momentos, la lactancia materna exclusiva en combinación con la terapia antiretroviral infantil o maternal se considera la mejor opción en dichos países.

El segundo caso en el que puede estar indicado evitar la lactancia materna es la infección con los virus linfotróficos de células T humanas o HTLV (del inglés *Human T-lymphotropic virus*) 1 y 2. La transmisión de estos virus requiere la transferencia de linfocitos T vivos infectados presentes en algún fluido biológico. De las posibles vías de transmisión de la madre al hijo, una de las principales es la leche materna. El riesgo de infección aumenta si el periodo de exposición supera los seis meses (es decir, con lactancias prolongadas) y con el tamaño de la carga proviral en la leche materna (Carneiro-Proietti *et al.*, 2014). Por este motivo, para prevenir la transmisión madre-hijo de estos virus, no se recomienda la lactancia materna o se limita la duración. Sin embargo, en el caso del virus HTLV-1 la congelación parece ser un tratamiento efectivo para prevenir la transmisión del virus de la madre al hijo (Ando *et al.*, 1989).

En cambio, no existe contraindicación para la lactancia en el caso de que la madre sea seropositiva para citomegalovirus. En este caso, la congelación no elimina el virus de la leche, sino que es necesario someterla a un tratamiento de pasteurización con la desventaja de que este tratamiento también afecta a un gran número de factores bioactivos (Hamprecht *et al.*, 2004).

Otras situaciones que podrían requerir evitar la lactancia, al menos temporalmente, serían las relacionadas con la administración de ciertos medicamentos (psicoterapéuticos sedativos, antiepilépticos, opiodes y sus combinaciones o quimioterapia citotóxica) o el consumo de drogas de abuso (WHO/UNICEF, 2009b; Lawrence y Lawrence, 2011). Aunque son relativamente pocos los medicamentos que están contraindicados durante la lactancia, cada caso debe evaluarse individualmente teniendo en cuenta los parámetros farmacocinéticos del medicamento en la madre y la absorción, metabolismo, distribución, almacenamiento y excreción en el lactante.

En otras ocasiones la imposibilidad de amamantar se debe a ciertas afecciones infantiles, que afortunadamente tienen una incidencia muy baja. Éste es el caso de la galactosemia clásica, la enfermedad del jarabe de arce (o de la orina con olor a jarabe de arce) y la fenilcetonuria, que requieren el empleo de fórmulas infantiles especiales (WHO/UNICEF, 2009a).

Aunque no se puede hablar de contraindicación, la lactancia materna puede aumentar la exposición del lactante a ciertos contaminantes ambientales indeseables por su toxicidad, persistencia y bioacumulación, como bifenilos policlorados (PCBs), dicloro difenil tricloroetano (DDT), dioxinas, dibenzofuranos, éteres difenílicos polibromados (PBDEs) y metales pesados (Donovan, 2008).

Por último, en algunos casos las madres perciben la lactancia como un inconveniente si deben cambiar drásticamente su estilo de vida para amamantar a su hijo. En caso de no optar por la lactancia, esa decisión debe ser respetada y apoyada por los profesionales sanitarios.

## II.2. MICROBIOTA DE LA LECHE HUMANA

Un componente de la leche que ha generado un gran interés en los últimos años por su importante repercusión en la salud del niño y de la madre es su microbiota. Tradicionalmente se consideraba que la leche de todos los mamíferos era un fluido estéril, excepto cuando procedía de una glándula infectada. Esto no es de extrañar puesto que los escasos estudios microbiológicos que se realizaban estaban relacionados con el análisis de muestras obtenidas de mujeres con mastitis (Marshall *et al.*, 1975; Thomsen, 1982; Thomsen *et al.*, 1983; Matheson *et al.*, 1988). Por otra parte, estos estudios estaban basados en el empleo de medios de cultivo dirigidos a la identificación de microorganismos patógenos. La presencia de otros grupos bacterianos siempre se asociaba a una contaminación con microorganismos comensales producida durante la toma de la muestra (Carroll *et al.*, 1979; Eidelman y Szilagyi, 1979; El-Mohandes *et al.*, 1993).

En las últimas décadas se ha demostrado que la leche materna, como sucede con otros fluidos biológicos, contiene una microbiota diversa y compleja (Heikkilä y Saris, 2003; Martín *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2004; Beasley y Saris, 2004; Jiménez *et al.*, 2008a; Marín *et al.*, 2009; Hunt *et al.*, 2011; Jost *et al.*, 2013). Además, la existencia de una microbiota específica en la leche no es una característica exclusiva de la especie humana sino que es un rasgo común a todos los mamíferos (Martín *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2010; Quigley *et al.*, 2015).

### II.2.1. COMPOSICIÓN BACTERIOLÓGICA DE LA LECHE HUMANA

Uno de los primeros estudios que describía la microbiota comensal de la leche materna obtenida de mujeres sanas sostenía que se podían aislar bacterias en todas (un total de 40) las muestras analizadas (Heikkilä y Saris, 2003). Los grupos más abundantes eran los de los aislados pertenecientes a los géneros *Staphylococcus* (64%) y *Streptococcus* (30%). La especie *Staphylococcus epidermidis*, además, estaba presente en prácticamente todas las muestras analizadas y en algunos casos era la única encontrada. Entre otras especies halladas en estas muestras se incluían *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus parasanguis*, *Staphylococcus capitis* y *Staphylococcus hominis*. También se describía la existencia, aunque en menor proporción, de bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*, probablemente porque el medio de cultivo empleado favorecía su aislamiento (Heikkilä y Saris, 2003).

En ese mismo año no sólo se confirmó la presencia de bacterias lácticas en la leche materna, en particular de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus*, sino que se descartó la hipótesis de que su presencia en la leche fuese el resultado de una mera contaminación. También se indicó que estas bacterias comensales de la leche materna podrían ser de gran importancia en la colonización intestinal del recién nacido (Martín

*et al.*, 2003). Estudios posteriores, aplicando una gran diversidad de técnicas, confirmaron la presencia de estos géneros así como de otros géneros de bacterias Gram-positivas (*Leuconostoc*, *Actinomyces*, *Gemella*, *Rothia*...) (Martín *et al.*, 2007a; Martín *et al.*, 2007b). Aunque menos abundantes y frecuentes, también se encuentran bacterias Gram-negativas (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*). La presencia de estas últimas suele asociarse al uso de bombas de extracción o sacaleches (Jiménez *et al.*, 2008a; Jiménez *et al.*, 2008b; Marín *et al.*, 2009).

El aislamiento de bacterias anaerobias estrictas suele entrañar una mayor dificultad por sus particulares condiciones de cultivo. Sin embargo, también se han aislado bacterias anaerobias de los géneros *Bifidobacterium* y *Veillonella* en muestras de leche materna (Grönlund *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2009; Marín *et al.*, 2009; Jost *et al.*, 2013; Soto *et al.*, 2014). Es muy posible que algunos microorganismos tengan, incluso, un requerimiento estricto de la presencia de componentes del hospedador o de otros microorganismos para su crecimiento, como ocurre en los ecosistemas naturales. De ahí la clásica afirmación de que las bacterias que se pueden cultivar en el laboratorio son sólo una pequeña fracción de la diversidad total que existe en la naturaleza (Stewart, 2012). En consecuencia, en estos momentos no se dispone de la tecnología necesaria para el aislamiento de un gran número de microorganismos.

La composición de la leche humana también se ha analizado aplicando distintos métodos moleculares (desde la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización hasta las técnicas de secuenciación masiva) (Martín *et al.*, 2009; Hunt *et al.*, 2011; Cabrera-Rubio *et al.*, 2012; Soto *et al.*, 2014). Estos métodos son muy potentes y hacen posible la detección de secuencias genómicas bacterianas incluso en muestras en las que no se observa crecimiento bacteriano con las técnicas clásicas de cultivo (Hunt *et al.*, 2011). Sin embargo, tienen la desventaja de que no permiten confirmar la viabilidad ni la cantidad de bacterias presentes. Además, en muestras que contienen una baja densidad de biomasa bacteriana, como ocurre con la leche humana, si no se emplean los controles adecuados los resultados obtenidos pueden ser erróneos. Esto se debe a que se puede amplificar DNA contaminante, sobre todo de bacterias Gram-negativas, presente en los kits de extracción de DNA y otros reactivos de laboratorio (Salter *et al.*, 2014). Por otra parte, estas técnicas independientes de cultivo pueden introducir un sesgo en los resultados porque no todas las especies bacterianas tienen la misma respuesta a los protocolos de lisis para el aislamiento y la amplificación del DNA (Reysenbach *et al.*, 1992).

A pesar de esas limitaciones, en los últimos años se han publicado numerosos estudios que, basándose en este tipo de técnicas, han confirmado que la leche humana contiene una comunidad de bacterias muy diversa y compleja (Hunt *et al.*, 2011; Cabrera-Rubio *et al.*, 2012; González *et al.*, 2013; Jost *et al.*, 2013; Ward *et al.*, 2013; Khodayar-Pardo *et al.*, 2014; Jiménez *et al.*, 2015) (Tabla 9). Estos estudios corroboran que los géneros mayoritarios son *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y,

en menor medida, *Propionibacterium* y describen con frecuencia la presencia de distintos géneros de bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*). También se ha detectado la presencia de una pequeña cantidad de DNA de *Bifidobacterium* y *Veillonella* y de otras bacterias anaerobias estrictas, como *Bacteroides* y varios miembros de la clase *Clostridia*: *Blautia*, *Dorea* y *Ruminococcus*, así como de varios productores de butirato como *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Coprococcus* y *Subdoligranulum* (Jost *et al.*, 2013). Estas bacterias, que son muy difíciles de aislar por su sensibilidad al oxígeno, se encuentran habitualmente en el intestino humano y tienen una estrecha relación con la salud intestinal.

## II.2.2. FACTORES QUE MODIFICAN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA DE LA LECHE HUMANA

Tanto si se emplean técnicas clásicas dependientes de cultivo como independientes de cultivo, la mayoría de los estudios realizados hasta el momento resaltan la gran diversidad observada en la microbiota de la leche materna. El perfil de especies bacterianas que contiene la leche materna es específico de cada hospedador y existe una gran variabilidad interindividual (Martín *et al.*, 2007a; Hunt *et al.*, 2011; Cabrera-Rubio *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2013). Se puede considerar que la leche de cada mujer tiene una composición bacteriana única, a modo de huella dactilar, como sucede en otras microbiotas. En este contexto, el primer estudio del microbioma de la leche humana, en el que se utilizaron técnicas basadas en la pirosecuenciación de la región V1–V2 del gen 16S rRNA, para caracterizar las comunidades bacterianas de la leche muestras proporcionadas por 16 mujeres sanas durante un periodo de cuatro semanas, concluye que dichas comunidades son muy diversas y complejas y relativamente estables en el tiempo para un mismo individuo (Hunt *et al.*, 2011). Los resultados mostraron que la leche humana posee un microbioma complejo, compuesto de una parte común (*core*) y otra variable. El microbioma común (aquellos géneros detectados en todas las muestras de todas las mujeres) comprendía 9 géneros (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas* y *Bradyrhizobiaceae*), aunque su abundancia relativa variaba notablemente dependiendo de cada mujer. Este microbioma común comprendía alrededor de la mitad de las comunidades bacterianas detectadas en las muestras analizadas, siendo la mitad restante el microbioma variable. Esta variabilidad se aprecia incluso en las muestras tomadas de distinto pecho de la misma mujer (Tušar *et al.*, 2014).

En este momento se desconoce si las diferencias observadas en los distintos estudios sobre la microbiota de la leche humana se deben a cuestiones metodológicas (por ejemplo, si la areola mamaria/pezón se ha lavado o tratado con algún antiséptico o no antes de la toma de muestra o el método de ruptura de las células para la extracción del DNA), ambientales (como la dieta materna) o fisiológicas (por ejemplo, genéticas).

**Tabla 9.** Principales géneros de bacterias detectados en la leche materna mediante técnicas independientes de cultivo

				Método de análisis	Muestras (n)	Tiempo posparto (d)	Referencia
Bifidobacterium	x			Cultivo	8	4	1
Corynebacterium	x			RAPD			
Propionibacterium				PCR tiempo real*	61		2
	x			qPCR	50		3
	x			Cultivo	20	1-90	4
				RAPD			
				Secuenciación gen 16S			
				Cultivo	30	30-720	5
				RAPD			
				Secuenciación gen 16S			
				MALDI-TOF			
	x			Cultivo	48		6
	x			Pirosecuenciación			
				qPCR	56	1-180	7
x				qPCR	18	1-180	8
				Pirosecuenciación			
x				Cultivo	55	<14-360	9
				qPCR			
				Bradyrhizobium	x		
				Sphingomonas	x		
				Ralstonia	x		
				Acinetobacter			
				Escherichia			
				Pseudomonas	x		
				Serratia			
				Weissella			
				Veillonella			
				Streptococcus	x		
				Staphylococcus	x		
				Leuconostoc			
				Lactococcus			
				Lactobacillus	x		
				Enterococcus	x		
				Eubacterium	x		
				Clostridium cluster IV			
				Clostridium cluster xIVa-xIVb	x		
				Bacteroides	x		

**Tabla 9 (Continuación).** Principales géneros de bacterias detectados en la leche materna mediante técnicas independientes de cultivo

		Bacteroides	Clostridium cluster xIVa-xIVb Clostridium cluster IV <i>Eubacterium</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Weillonella</i> <i>Weissella</i>	<i>Bradyrhizobium</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Ralstonia</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Serratia</i>	Método de análisis	Muestras (n)	Tiempo posparto (d)	Referencia
<i>Bifidobacterium</i>	x				Cultivo	5	3-30	10
<i>Corynebacterium</i>					Pirosecuenciación RAPD			
<i>Propionibacterium</i>					Secuenciación Sanger			
					Secuenciación (Illumina)	1**	9-30	11
x					qPCR***	32	1-18	12
x					qPCR	24	30	13
x					Secuenciación Ion Torrent	9		14
x					Cultivo RAPD	47	30	15
x					Secuenciación gen 16S			
					Cultivo PCR****	160	7-28	16

\*Cebadores específicos para *Bifidobacterium*; \*\*Mezcla de 10 muestras; \*\*\*Específica para *Bifidobacterium*; \*\*\*\*Cebadores específicos para *Lactobacillus y Bifidobacterium*.

1, Martín *et al.* (2003); 2, Grönlund *et al.* (2007); 3, Collado *et al.* (2009); 4, Solís *et al.* (2010); 5, Albesharat *et al.* (2011); 6, Hunt *et al.* (2011); 7, Collado *et al.* (2012); 8, Cabrera-Rubio *et al.* (2012); 9, González *et al.* (2013); 10, Jost *et al.* (2013); 11, Ward *et al.* (2013); 12, Khodayar-Pardo *et al.* (2014); 13, Olivares *et al.* (2015); 14, Urbaniak *et al.* (2014); 15, Tušar *et al.* (2014); 16, Soto *et al.* (2014). Fuente: Adaptado de McGuire y McGuire (2015).



Lo cierto es que esa variabilidad hace que de momento sea imposible describir cuál es el microbioma “normal” de la leche materna. Por otra parte, es probable que ésta sea una situación deseable puesto que hay una gran diferencia en las necesidades de distintas poblaciones infantiles y la composición de la leche debe adaptarse a las necesidades específicas de cada individuo (McGuire y McGuire, 2015).

Varios estudios identifican como factores que pueden modificar la composición de la microbiota materna el tipo de parto (vaginal o cesárea) y el tiempo de lactancia. Así, las muestras de leche obtenidas de mujeres que han sufrido cesárea son más uniformes en cuanto al perfil de microorganismos, y tienen menor contenido de bifidobacterias y lactobacilos que las de mujeres que han tenido un parto vaginal (Cabrera-Rubio *et al.* 2012; Khodoyar-Pardo *et al.*, 2014; Soto *et al.*, 2014). También cambia el perfil de microorganismos presentes en el calostro (predominan *Weisella*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Lactococcus*) con respecto al de la leche madura (donde son más abundantes *Veillonella*, *Leptotrichia* y *Prevotella*) (Cabrera-Rubio *et al.*, 2012). Igualmente, la leche de las mujeres que han tenido un parto prematuro muestra una menor abundancia de bacterias que la de las mujeres que han tenido un parto a término (Khodoyar-Pardo *et al.*, 2014; Moles *et al.*, 2015).

La dieta materna probablemente también juegue un papel determinante en la microbiota de su leche, como han puesto de manifiesto recientemente Albesharat *et al.* (2011). Algunas bacterias aisladas por estos investigadores de alimentos fermentados tradicionales obtenidos de los mercados locales (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus brevis*) también podían aislarse de muestras de leche materna. Por otro lado, el peso corporal de la madre también parece modelar el perfil microbiológico de la leche materna. En las muestras obtenidas de mujeres con sobrepeso las bacterias relacionadas con el género *Staphylococcus* y la especie *Akkermansia muciniphila* eran más abundantes que en las de mujeres con peso normal; con las bifidobacterias se observaba el fenómeno opuesto (Collado *et al.*, 2012). No obstante, el número de estudios es muy escaso y serán necesarias más investigaciones para confirmar o desmentir estos resultados.

El estado de salud de la madre es otro factor importante. Se han registrado diferencias en la composición de la microbiota de la leche de madres celiacas (Olivares *et al.*, 2015), con alergia (Grönlud *et al.*, 2007), positivas para VIH (González *et al.*, 2013) o que están recibiendo quimioterapia (Urbaniak *et al.*, 2014) en relación con lo observado en madres sanas. Pero quizá uno de los factores más destacables sea la administración de antibióticos. Recientemente se ha descrito que la administración de antibióticos durante el embarazo o la lactancia provoca cambios drásticos en la microbiota de la leche, reduciendo la frecuencia de detección de lactobacilos y bifidobacterias en la leche materna alrededor de un 50% (Soto *et al.*, 2014). Es probable que los cambios anteriormente mencionados, o al menos parte de ellos, en relación al tipo de parto sean debidos a la administración de antibióticos asociada a las cesáreas.

La compleja composición de la leche materna, que como se ha señalado en el apartado II.1.5 incluye diversos nutrientes, hormonas, factores de crecimiento, células del sistema inmunitario, citoquinas y otros componentes con actividad biológica, también podría contribuir a modelar la microbiota de este fluido biológico. Las variaciones en la composición de la leche, en concreto el tipo y abundancia de oligosacáridos o de ácidos grasos, podrían influir en la diversidad y composición de esta microbiota (Hunt *et al.*, 2012; Musilova *et al.*, 2014).

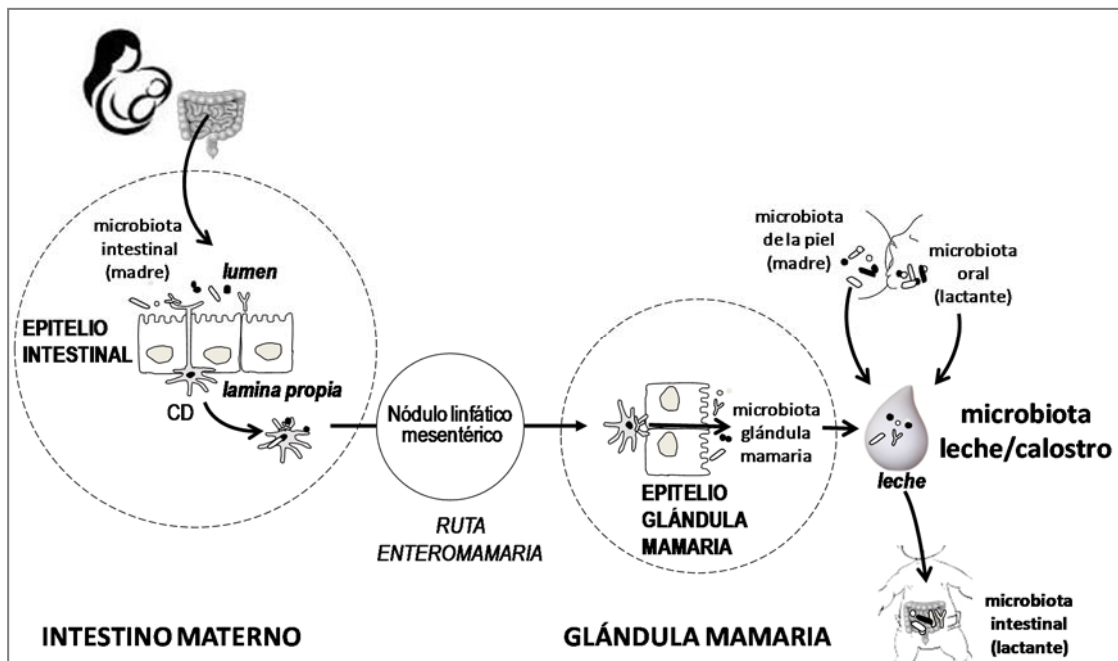
### II.2.3. ORIGEN DE LAS BACTERIAS PRESENTES EN LA LECHE HUMANA

Como ya se ha mencionado, los resultados obtenidos en uno de los primeros trabajos relacionados con el estudio de la microbiota de la leche materna (Martín *et al.*, 2003) descartaban que la hipótesis de que la procedencia de estas bacterias fuera la microbiota presente en la piel del pecho. Según esta hipótesis, el recién nacido se colonizaría con la microbiota vaginal y rectal de la madre durante el parto y transferiría parte de los microorganismos a la piel del pecho de la madre durante el amamantamiento; las bacterias presentes en la piel del pecho podrían “contaminar” la leche durante la eyección e, incluso, colonizar la glándula mamaria lactante (Figura 15). Esta hipótesis se fundamenta en que los géneros mayoritarios en la leche son *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* (géneros habituales en la piel). Esta coincidencia ha contribuido a que esta idea se haya mantenido vigente durante mucho tiempo (Rosenthal *et al.*, 2011).

Por otra parte, se ha descrito que durante la toma se produce un cierto flujo retrógrado de la leche que se encuentra en la boca del niño hacia los conductos de la glándula mamaria, promoviendo el intercambio de bacterias (Ramsay *et al.*, 2004). El género *Streptococcus* es, precisamente, uno de los más abundantes en la cavidad oral del lactante (Jiménez *et al.*, 2008a; Jiménez *et al.*, 2008b; Hunt *et al.*, 2011; Zaura *et al.*, 2014). Aunque no se puede descartar que ésta sea una vía de acceso para las bacterias, es probable que haya otra ruta ya que se pueden aislar bacterias del calostro obtenido antes de que se inicie la lactancia e incluso del pre-calostro antes del nacimiento del niño (Jiménez *et al.*, 2008a).

El hecho de poder aislar de la leche humana bacterias pertenecientes a géneros que se caracterizan por su estricto carácter anaerobio y por su estrecha asociación con el intestino (*Bifidobacterium*, *Veillonella*) es un claro indicio de la existencia de una ruta alternativa y que ésta debe ser, muy probablemente, de origen endógeno: es la denominada ruta enteromamaria (Rodríguez, 2014) (Figura 15). Varios autores han demostrado que las bacterias que colonizan el intestino neonatal proceden del intestino materno, relegando la importancia de la contribución de la microbiota vaginal materna a este proceso (Matsumiya *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2007b; Makino *et al.*, 2011). Esta ruta endógena está relacionada con la presencia de células dendríticas en la lámina propia del intestino y su capacidad de emitir dendritas que pueden atravesar el epitelio

intestinal, sin comprometer su integridad, e interaccionar con las bacterias que se encuentran en el lumen intestinal (Rescigno *et al.*, 2001). Las células dendríticas activadas pueden transportar las bacterias a través de la circulación sanguínea hasta la glándula mamaria, siendo secretadas en la leche (Martín *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2007). De hecho, hay una mayor tasa de translocación bacteriana en el intestino durante el embarazo y la lactancia y una mayor presencia de monocitos conteniendo bacterias en la sangre periférica y en el tejido de la glándula mamaria durante el final del embarazo y la lactancia (Donnet-Hughes *et al.*, 2010).



**Figura 15.** Posibles rutas para el establecimiento de la microbiota de la leche materna. Los cambios fisiológicos durante el embarazo y la lactancia favorecen la migración de bacterias hacia la glándula mamaria con ayuda de las células del sistema inmunitario para el establecimiento y desarrollo de la microbiota de la glándula mamaria. Los miembros de la microbiota de la piel de la madre y de la cavidad oral del lactante también pueden contribuir a la formación de la microbiota de la leche.

#### II.2.4. FUNCIONES DE LA MICROBIOTA DE LA LECHE HUMANA

Independientemente de la ruta utilizada, una de las principales funciones de la microbiota de la leche materna es la colonización del intestino del recién nacido. La transmisión microbiana de la madre a la descendencia, lejos de ser una anomalía, es un fenómeno universal en el reino animal (Funkhouser y Bordenstein, 2013). En los mamíferos esta transmisión se iniciaría durante la gestación. La placenta y el útero,

considerados hasta hace poco estériles para mantener al feto libre de infecciones, también tienen su microbiota propia; es decir, la colonización del feto se inicia en el útero a través de la placenta (Jiménez *et al.*, 2005; Aagaard *et al.*, 2014).

Dicha colonización continuaría durante el nacimiento y la lactancia a través de la leche materna. Un lactante que ingiera unos 800 mL de leche diarios recibirá con ella entre  $10^5$  y  $10^7$  bacterias al día (Martín *et al.*, 2004). Esto asegura una correcta colonización microbiana de la descendencia y, en consecuencia, permite que el progenitor dirija y controle la transmisión de una vasta cantidad de información genética asociada al microbioma. En este sentido, diversos estudios han confirmado que la leche materna y las heces del lactante de cada par madre-hijo lactante comparten las mismas cepas de bacterias pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Albesharat *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2012; Makino *et al.*, 2015). Esto indica que la leche materna contribuye a la transferencia de bacterias desde la madre a su hijo lactante y, por lo tanto, a la colonización intestinal del niño (Martín *et al.*, 2012). De hecho, el tipo de alimentación que recibe el niño (leche materna o de fórmula) tiene una gran influencia en la microbiota intestinal del niño. En las heces de los lactantes alimentados con leche materna hay un claro predominio de *S. epidermidis*, la bacteria cultivable más abundante en la leche materna (Jiménez *et al.*, 2008b).

La colonización del intestino es clave por todas las funciones que desempeña la microbiota intestinal del lactante: contribuye a protegerle de infecciones, programa su sistema inmunitario innato, participa en la digestión de nutrientes, proporciona distintas sustancias bioactivas y potencia un adecuado desarrollo cognitivo (Sommer y Bäckhed, 2013). Esta microbiota, al modular el desarrollo inicial de la respuesta inmunitaria, también puede ayudar a prevenir en etapas posteriores de la vida enfermedades como el asma, las enfermedades inflamatorias intestinales o la diabetes de tipo 1 (Walker e Iyengar, 2015). Por otra parte, algunas cepas de *Bifidobacterium breve* aisladas de leche humana tienen la capacidad de sintetizar lípidos bioactivos como los ácidos linoleico y linolénico conjugados (Villar-Tajadura *et al.*, 2014). Por todo ello, la leche materna se considera como nuestro primer alimento probiótico (Martín *et al.*, 2003; McGuire y McGuire, 2015).

En los últimos años se está poniendo de manifiesto la importancia de las primeras interacciones entre la microbiota y el hospedador en la salud a corto y largo plazo. En el caso de la leche materna, este beneficio se extendería no sólo al niño sino también a la madre (Bergmann *et al.*, 2014). De hecho, recientemente se ha sugerido que existe una estrecha relación entre una disbiosis en el tejido mamario y el cáncer de mama (Xuan *et al.*, 2014). En definitiva, toda la evidencia disponible apoya la conveniencia de promover la lactancia materna exclusiva con una duración adecuada para obtener el máximo beneficio para la pareja madre-lactante.

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que algunas bacterias aisladas de la leche materna, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y que han sido caracterizadas con gran detalle, tienen un enorme potencial como probióticos tanto para niños, incluyendo prematuros, como para adultos, incluyendo las mujeres lactantes en aquellas ocasiones en que se producen situaciones de disbiosis (Olivares *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2008c; Arroyo *et al.*, 2010; Gil-Campos *et al.*, 2012; Maldonado *et al.*, 2012; Maldonado-Lobón *et al.*, 2015; Moles *et al.*, 2015). La secuenciación y el análisis de los genomas de algunas de estas cepas está proporcionando pruebas adicionales relacionadas con su seguridad y su potencial como probióticos (Jiménez *et al.*, 2010a; Jiménez *et al.*, 2010b; Jiménez *et al.*, 2012; Langa *et al.*, 2012; Martín *et al.*, 2013)

### II.3. MASTITIS INFECCIOSAS DURANTE LA LACTANCIA

La mastitis infecciosa es una patología común entre las madres lactantes y constituye una de las primeras causas de destete precoz (WHO, 2000; Foxman *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2008; U.S. Department of Health and Human Services, 2011; Fernández y Rodríguez, 2014). En consecuencia, esta enfermedad debe considerarse un problema de Salud Pública relevante (Contreras y Rodríguez, 2011; WHO, 2000), ya que priva a la pareja madre-hijo de los beneficios de lactancia (Ip *et al.*, 2009; U.S. Department of Health and Human Services, 2011; American Academy of Pediatrics-Section on Breastfeeding, 2012; Geddes y Prescott, 2013).

En España, el número de centros adscritos a la *Iniciativa para la Humanización de la Asistencia al Nacimiento y la Lactancia* (IHAN) y el de grupos de apoyo a la lactancia ha aumentado notablemente durante la última década (Hernández-Aguilar *et al.*, 2014). Sin embargo, en contraste con este renovado interés que la lactancia y la leche materna están recibiendo en la actualidad, la mastitis lactacional es todavía una gran desconocida para la comunidad médica española. En este sentido, el documento “Recomendaciones sobre Lactancia Materna” publicado por el *Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría* (CLMAEP) (2012), ni siquiera menciona la mastitis como una patología frecuente durante la lactancia. Asimismo, en el plano internacional, resulta sorprendente que en las “*Guidelines for hospital discharge of the breastfeeding term newborn and mother: the going home protocol*” publicadas por la *Academy of Breastfeeding Medicine* (Evans *et al.*, 2014), tampoco se alude al término mastitis, cuando el objetivo de estas guías es anticiparse a cualquier problema médico que pudiera interferir con el éxito de la lactancia. De hecho, un estudio reciente destaca que el 20% de las madres no reciben un asesoramiento adecuado durante la lactancia sobre la mastitis y otros problemas (Eisenberg *et al.*, 2015).

La mastitis es más frecuente en las primeras etapas de la lactancia (segunda y tercera semanas posparto) y la mayoría de los estudios indican que entre el 75 y el 95% de los casos ocurren durante los primeros 3 meses aunque puede aparecer en cualquier momento de la lactancia (Contreras y Rodríguez, 2011). Su incidencia oscila, dependiendo de los estudios, entre el 3 y el 33% de las madres lactantes. Esta disparidad de cifras se debe fundamentalmente a que, en el primer caso, únicamente se consideran las mastitis agudas mientras que en el segundo se incluyen también las subagudas, que suelen estar muy infradiagnosticadas. En consecuencia, la incidencia de la mastitis está realmente subestimada debido a las diferencias en la definición de “caso” y a que esta patología no se notifica habitualmente (Foxman *et al.*, 2002; Betzold, 2007; Scott *et al.*, 2008; Spencer, 2008). En España se estima en torno al 10% (Díaz, 2004), aunque se carece de datos epidemiológicos concretos. En cualquier caso, ante la ausencia de un diagnóstico etiológico y la frecuente prescripción de un tratamiento inadecuado debido al desconocimiento habitual acerca de este problema entre la comunidad médica (Amir e Ingram, 2008; Scott *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009a; Jiménez *et al.*, 2009), las

mujeres con este problema suelen enfrentarse al dilema de seguir amamantando a su hijo aguantando el dolor y el resto de síntomas o abandonar de forma precoz la lactancia.

Estudios recientes han relacionado la etiopatogenia de la mastitis con un proceso de disbiosis o desequilibrio de la diversidad bacteriana de la glándula mamaria, que da lugar al sobrecrecimiento de las especies que causan la infección, acompañado de la disminución de otras de las especies presentes de manera fisiológica en la leche humana (Delgado *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009a; Contreras y Rodríguez, 2011; Fernández y Rodríguez, 2014). A medida que aumenta la concentración de las bacterias responsables de la mastitis, se inducen una serie de cambios físicos, bioquímicos e inmunológicos en la glándula mamaria y en la leche, que se manifiestan como síntomas clínicos. Estos cambios son específicos según el agente etiológico, como se ha puesto de manifiesto en la mastitis bovina mediante el análisis de compuestos volátiles que permiten clasificar la leche procedente de vacas con mastitis de acuerdo con el tipo de patógeno (Hettinga *et al.*, 2008; Hettinga *et al.*, 2009). La aplicación de las técnicas -ómicas a la leche humana sin duda proporcionará otros marcadores de mastitis en el futuro y nuevos conocimientos sobre el proceso que lleva desde una microbiota mamaria sana hasta la mastitis. De hecho, en un estudio reciente en el que se analiza el microbioma de leche de mujeres con mastitis se ha puesto de manifiesto la pérdida de biodiversidad bacteriana que acompaña a esta patología (Jiménez *et al.*, 2015).

Sin embargo, a pesar de los avances en el conocimiento de la etiopatogenia de esta enfermedad, el diagnóstico etiológico se realiza en raras ocasiones y, en consecuencia, los estudios microbiológicos son escasos y el papel de las bacterias patógenas implicadas todavía está poco estudiado. Este aspecto se contemplará en el apartado relativo a los agentes etiológicos causantes de mastitis infecciosas (apartado II.3.3). Esta situación es muy diferente en Medicina Veterinaria, donde los análisis microbiológicos se realizan rutinariamente debido al impacto económico de esta enfermedad en el sector lácteo (Contreras y Rodríguez, 2011; Britten, 2012; Deb *et al.*, 2013).

### II.3.1. CONCEPTO DE MASTITIS

Una definición amplia de mastitis sería la inflamación de la glándula mamaria, incluyendo no solo el tejido intramamario, sino las estructuras anatómicas relacionadas, tales como los pezones, areolas o conductos galactóforos. En Medicina Veterinaria, el concepto de mastitis siempre se relaciona con una reacción inflamatoria intramamaria causada por un agente infeccioso (Contreras y Rodríguez, 2011). En cambio, la literatura concerniente a las mastitis humanas a veces diferencia entre un proceso infeccioso o no infeccioso (WHO, 2000; Kvist, 2010; Amir y *Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee*, 2014). Esta distinción se debe a que en el pasado la mayoría de las mastitis se diagnosticaban mediante una valoración visual sin análisis microbiológico, aplicándose el término “mastitis infecciosa” para describir casos agudos

normalmente causados por *Staphylococcus aureus*, mientras que las mastitis subagudas, de sintomatología más leve, se diagnosticaban erróneamente como “no infecciosas”.

Por tanto, en la actualidad podríamos definir las mastitis como un proceso infeccioso de la glándula mamaria que se acompaña de síntomas locales y sistémicos (Lawrence y Lawrence, 2011; Beltrán Vaquero *et al.*, 2015). Asimismo, esta definición de las mastitis humanas como enfermedades infecciosas permite diferenciar esta patología de otros procesos inflamatorios de la glándula mamaria, como el cáncer de pecho (Renz *et al.*, 2008), o del síndrome de Raynaud, un vasoespasmo doloroso que se produce en el pezón durante el amamantamiento en algunas mujeres (Delgado *et al.*, 2009c).

En la práctica coexisten, creando cierta confusión, diversos términos relacionados con problemas durante la lactancia (ingurgitación, obstrucción, retención, estasis de leche, grietas, pezones doloridos, etc.), que se han considerado factores predisponentes a una mastitis infecciosa (Díaz, 2004). Sin embargo, dado que los agentes bacterianos implicados en las mastitis lactacionales tienen capacidad *per se* para provocar la obstrucción de conductos y/o grietas parece cada vez más evidente que tales situaciones no predisponen a un proceso infeccioso, sino que, realmente, constituyen manifestaciones de una mastitis infecciosa (Delgado *et al.*, 2009a).

Como se contempla en una revisión sobre la etiología y epidemiología comparativa de las mastitis humanas y animales (Contreras y Rodríguez, 2011), las mastitis se clasifican en diferentes subgrupos dependiendo de diversos criterios, tales como su relación o no con la lactancia (lactacionales/puerperales o no lactacionales), su curso (agudas, subagudas, crónicas, recurrentes, etc.) o la presencia o no de síntomas clínicos (clínicas o subclínicas). En todos los mamíferos, la mastitis clínica se caracteriza por la aparición de síntomas de inflamación en la glándula mamaria, como dolor e induración, que pueden acompañarse (mastitis aguda) o no (mastitis subaguda) de síntomas sistémicos como fiebre. Asimismo, en bovinos y otros animales, se puede detectar de forma directa debido a los cambios organolépticos que se producen en la leche. La mastitis subclínica, que constituye el tipo más habitual en Medicina Veterinaria, se establece mediante la cuantificación de las células somáticas, siendo un recuento superior a 200.000 células/mL el límite que define este tipo de mastitis en vacuno (Contreras y Rodríguez, 2011). No obstante, en humanos, no hay un enfoque cuantitativo que permita diagnosticar la mastitis subclínica. En este contexto, el término subclínico debería utilizarse para describir aquellos procesos caracterizados por la ausencia de síntomas de inflamación externa, una secreción reducida de leche, un incremento del ratio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y un recuento bacteriano alto en una muestra obtenida de forma manual (Aryeetey *et al.*, 2008; Rasmussen *et al.*, 2008).



### **II.3.2. MASTITIS: ETIOLOGÍA, PATOGENIA Y SINTOMATOLOGÍA**

En general, se pueden distinguir diversos tipos de mastitis infecciosas durante la lactancia, que difieren en su etiología, patogenia, sintomatología y tratamiento. Además, dentro de cada tipo, los casos pueden oscilar desde leves a muy severos dependiendo de diversos factores, como la concentración bacteriana, el número de glándulas afectadas, la capacidad de succión del niño o el estado inmunitario de la mujer afectada, entre otros (Fernández y Rodríguez, 2014).

En este apartado se abordarán las principales características clínicas de los distintos tipos de mastitis y de los abscesos, que suponen una relevante complicación de las mastitis. Si bien se hará mención a los agentes etiológicos implicados en cada proceso, éstos se contemplarán de forma más detallada posteriormente (apartado II.3.3).

#### **II.3.2.1. Mastitis clínicas**

##### ***II.3.2.1.1. Mastitis agudas***

Las mastitis agudas son cuadros caracterizados por una intensa inflamación local (dolor, enrojecimiento, tumefacción, induración e ingurgitación) (Figura 16A), acompañada de síntomas sistémicos similares a los de la gripe: fiebre (que puede ser muy elevada), escalofríos, dolores musculares y articulares, malestar general e, incluso, náuseas y vómitos. En ocasiones, los ganglios axilares están inflamados, aunque a veces este signo se confunde con la inflamación de la extensión axilar de las glándulas mamarias. Se trata de las mastitis más evidentes desde un punto de vista clínico pero, sin embargo, no son las más frecuentes, representando, en el mejor de los casos, un 10–15% de los casos totales (Delgado *et al.*, 2009a).

Las mastitis agudas se deben, en la inmensa mayoría de los casos, a la presencia de *S. aureus* en la glándula mamaria (Reddy *et al.*, 2007; Stafford *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2011). Esta especie, a diferencia de otras del mismo género, no suele estar presente en la glándula mamaria en condiciones fisiológicas; sin embargo, muchas personas son portadoras (sintomáticas o asintomáticas) en las mucosas del tracto nasofaríngeo, digestivo o genitourinario, desde donde pueden colonizar la glándula mamaria durante la lactancia. Una vez allí, pueden proliferar y sintetizar toxinas que provocan una gran inflamación del tejido mamario, dando lugar a aparatosos síntomas locales. Teniendo en cuenta la gran vascularización de la glándula mamaria durante la lactancia, una parte importante de las toxinas se absorbe, pasa a la circulación sistémica y provoca un cuadro muy semejante al de la gripe. Además, estos microorganismos pueden provocar una importante ingurgitación del pecho a través de la creación de *biofilms* en los conductos galactóforos (Fox *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006), tal y como se detallará al hablar de las mastitis subagudas (apartado II.3.2.1.2). En un pequeño porcentaje de casos el tejido mamario reacciona tratando de aislar a las

bacterias causantes de la mastitis en una cápsula de tejido conjuntivo, lo que conduce a la formación de abscesos (Betzold, 2007; Lawrence y Lawrence, 2011).

#### ***II.3.2.1.2. Mastitis subagudas***

Son cuadros caracterizados por una inflamación local (dolor punzante, calambres, sensación de quemazón, induración e ingurgitación) pero, normalmente, sin la aparición de zonas de enrojecimiento en el pecho y sin la presencia de síntomas sistémicos (Figura 16C). Estos hechos confunden frecuentemente el diagnóstico y provocan que las mastitis subagudas constituyan un problema tan infravalorado como infradiagnosticado, a pesar de que representan la mayor parte de los casos de mastitis y de que pueden provocar síntomas locales evidentes. El síntoma dominante suele ser un dolor más o menos intenso, típicamente en forma de pinchazos (referido en muchas ocasiones como “cristales”, “agujas”...), con calambres ocasionales (que pueden llegar a ser muy acentuados y reflejarse en la espalda o el brazo) y, a veces, sensación de quemazón (Delgado *et al.*, 2009a).

En este caso, el problema se debe a un sobrecrecimiento de ciertas especies de estafilococos coagulasa-negativos (ECN) (*S. epidermidis* principalmente), estreptococos del grupo *viridans* (como *St. mitis* o *St. salivarius*) y algunas especies del género *Corynebacterium*. Todas ellas, a diferencia de *S. aureus*, son habituales en la glándula mamaria durante la lactancia pero a concentraciones muy moderadas ( $< 10^3$  unidades formadoras de colonia por mL, UFC/mL), a las que juegan papeles beneficiosos para el niño sin suponer ningún problema para la madre (Fernández *et al.*, 2013). A esas concentraciones, estas bacterias se disponen formando una película fina en los bordes internos de los conductos, permitiendo un flujo completamente normal de leche que, al salir, lleva algunas de estas bacterias en suspensión. Estas bacterias son las que se transfieren de la madre al hijo y se pueden detectar en un cultivo (Figura 17A) (Marín *et al.*, 2009; Jeurink *et al.*, 2013).

No obstante, hay ciertos factores, que se contemplarán en el apartado II.4.1 de esta introducción, que hacen que estas especies puedan crecer hasta alcanzar concentraciones muy por encima de las fisiológicas y conducir a una mastitis subaguda. También a diferencia de *S. aureus*, las especies implicadas en estos casos no sintetizan toxinas por lo que no pueden provocar ni un cuadro local agudo ni síntomas sistémicos. En este caso, el dolor se debe a que las bacterias, al sobrecrecer, forman densos *biofilms* en el interior de los conductos galactóforos, dispuestos en forma de capas concéntricas (Figura 17B). Este hecho conduce, por una parte, a la inflamación del epitelio mamario (al estar soportando una densidad bacteriana mucho mayor de lo normal) y, por otra, a que la leche tenga que pasar por un conducto cuya luz es cada vez más estrecha, de modo que la presión que ejerce es cada vez mayor. Esta mayor presión de la leche sobre un epitelio inflamado origina un dolor intenso en forma de pinchazos y calambres (Figura 17B) (Delgado *et al.*, 2009a).

Los conductos galactóforos tienen unas pocas micras de diámetro y se pueden obstruir por completo, debido a las capas bacterianas que se han formado de forma concéntrica; en consecuencia, se produce una ingurgitación o retención de leche que empeora los síntomas locales (dolor, endurecimientos focales). Es frecuente que este hecho proporcione a la madre la falsa sensación de que la producción de leche ha disminuido. Sin embargo, en estos casos, no está afectada la producción sino la secreción, ya que una parte importante de la leche que se produce no se secreta sino que se retiene y se reabsorbe, lo que afecta sensiblemente al caudal que se eyecta al exterior (Delgado *et al.*, 2009a; Jiménez *et al.*, 2009). Esta situación es muy relevante para la madre lactante y, de hecho, una falsa percepción de baja producción de leche (hipogalactia) es una de las principales causas de abandono de la lactancia (Li *et al.*, 2008; Odom *et al.*, 2013; Lou *et al.*, 2014; Teich *et al.*, 2014). La disminución del caudal de leche hace que las tomas sean más largas y frecuentes y que el lactante realice en ocasiones un amamantamiento más agresivo, hecho que acentúa la inflamación de la glándula mamaria.

#### ***II.3.2.1.3. Mastitis granulomatosas***

Las mastitis granulomatosas son inflamaciones benignas de la glándula mamaria poco frecuentes que generalmente afectan a mujeres en edad fértil algunos meses después de haber amamantado a un hijo (Pereira *et al.*, 2012; Hello *et al.*, 2013).

Habitualmente es un proceso unilateral que se manifiesta por una o más masas inflamatorias dolorosas, de consistencia firme y, a veces, con inflamación cutánea que casi siempre se ubica fuera de la areola mamaria (Figura 16F). Estas masas inflamatorias a menudo deforman el pecho afectado y pueden evolucionar hacia la formación de úlceras y abscesos, fistulización y/o supuraciones crónicas.

El diagnóstico de las mastitis granulomatosas suele crear confusión. Al examinar las zonas inflamadas externamente o mediante técnicas de imagen, éstas se asemejan mucho a las que se observan en mujeres con carcinoma de mama (Tuli *et al.*, 2007; Nzegwu *et al.*, 2007; Gurleyik *et al.*, 2012). Por ello, inicialmente se suele sospechar de cáncer o, alternativamente, de tuberculosis. Una vez que los análisis histopatológicos (imprescindibles para el diagnóstico diferencial) confirman que no se trata de ninguna de esas dos enfermedades, se suelen clasificar como mastitis granulomatosa, mastitis granulomatosa idiopática, mastitis lobular granulomatosa o lobulitis granulomatosa de “*etiología incierta*”.

Histológicamente, las lesiones se caracterizan por una lobulitis crónica, necrotizante, no caseificante, con formación de granulomas (Seo *et al.*, 2012). Los granulomas tienen una apariencia muy característica: una capa externa de histiocitos epitelioides que rodea a una colección de polimorfonucleares neutrófilos, que a su vez se disponen alrededor de un espacio central aparentemente vacío, constituido por lípidos



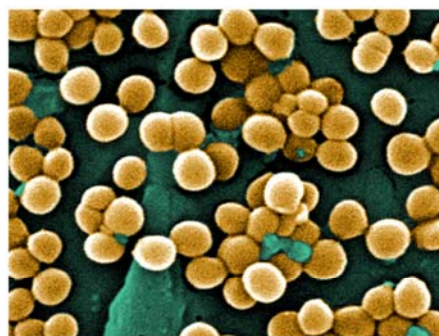
**Figura 16A.** Mastitis aguda  
Fuente: Delgado *et al.* (2009a)



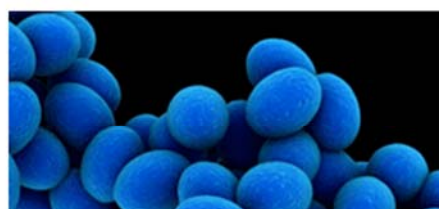
**Figura 16C.** Mastitis subaguda.  
Fuente: Delgado *et al.* (2009a)



**Figura 16F.** Mastitis granulomatosa  
Fuente: Tuli *et al.* (2007)



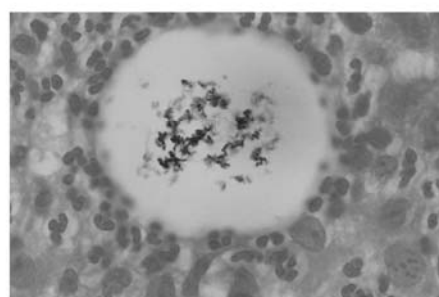
**Figura 16B.** *Staphylococcus aureus*  
Fuente: Janice Hancy Carr, CDC, USA)



**Figura 16D.** *Staphylococcus epidermidis*



**Figura 16E.** *Streptococcus salivarius*, especie incluida en los estreptococos del grupo *viridans*  
Fuente: Dennis Kunkel Microscopy Inc.



**Figura 16G.** Corinebacterias en el interior de un lipogranuloma (mastitis granulomatosa)  
Fuente: Paviour *et al.* (2002)

**Figura 16.** Tipos de mastitis y principales microorganismos implicados

disueltos (Paviour *et al.*, 2002; Bercot *et al.*, 2009), motivo por el que también reciben el nombre de lipogranulomas supurativos. Hasta hace apenas unos años la etiología de estos procesos era desconocida, pero actualmente se sabe que la mayoría de estas estructuras están causadas por bacterias del género *Corynebacterium* (Paviour *et al.*, 2002; Bercot *et al.*, 2009) y, de hecho, estas bacterias se pueden observar dentro de las vacuolas lipídicas centrales (Paviour *et al.*, 2002; Renshaw *et al.*, 2011) (Figura 16G).

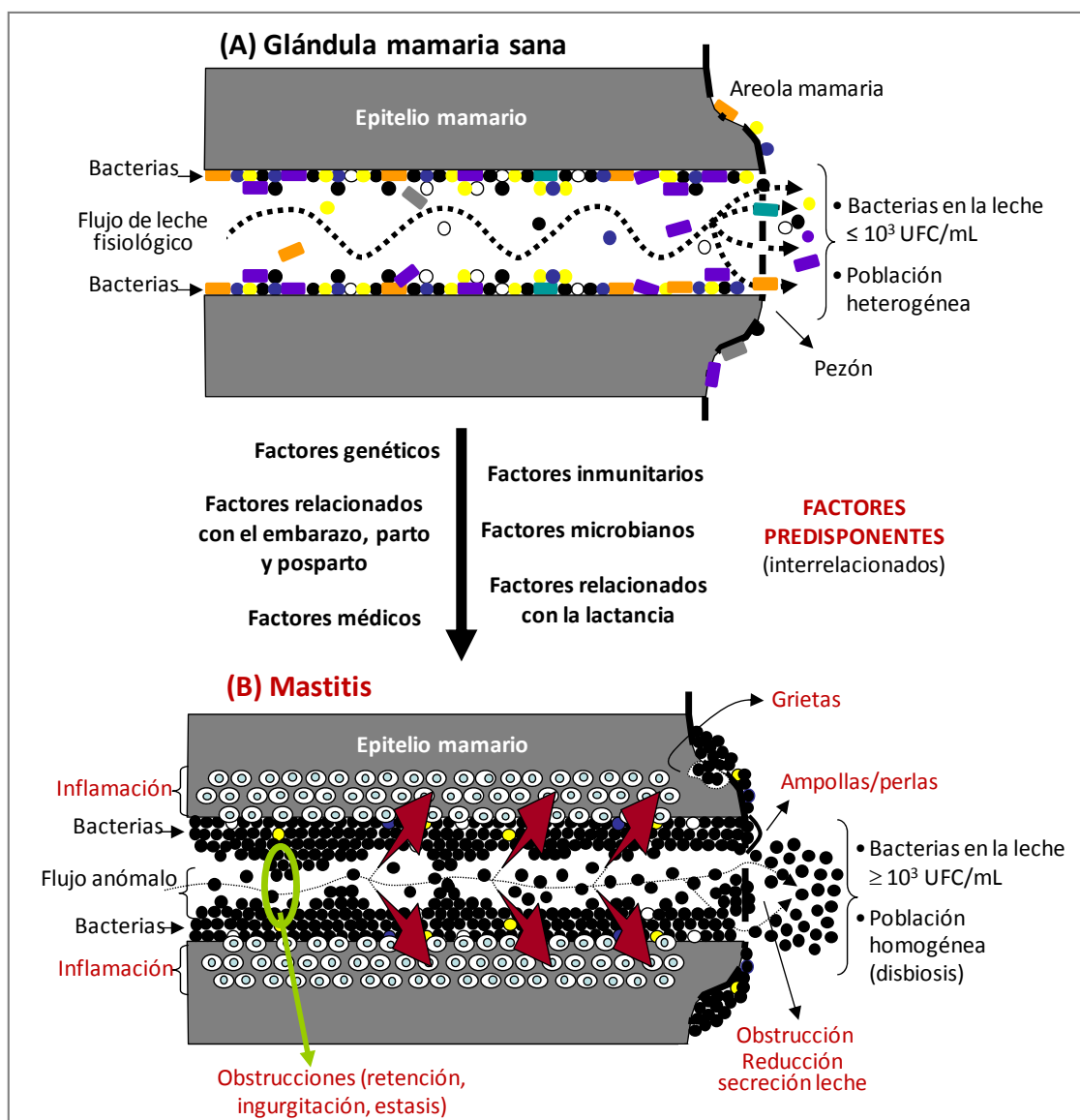
### **II.3.2.2. Mastitis subclínicas**

Las mastitis subclínicas son cuadros causados generalmente por las mismas especies que las subagudas pero que no han alcanzado concentraciones que lleguen a superar el umbral del dolor y no presentan los síntomas característicos de las mastitis clínicas (agudas y subagudas). En estos casos lo único que la madre lactante percibe habitualmente es la falsa sensación de poca producción de leche, que también acompaña al resto de tipos de mastitis. Como se ha comentado previamente (apartado II.3.2.1.2), en la gran mayoría de los casos la producción de leche no está comprometida; simplemente, la formación de *biofilms* en el interior de los conductos galactóforos impide su correcta secreción (Delgado *et al.*, 2009a; Jiménez *et al.*, 2009).

### **II.3.2.3. Abscesos**

La mayoría de los abscesos mamarios tienen su origen en la complicación de una mastitis infecciosa debido a un tratamiento tardío o inadecuado, a las características de la cepa bacteriana implicada o a la respuesta de la propia glándula mamaria (Ulitzsch *et al.*, 2004; Betzold, 2007; Lawrence y Lawrence, 2011). Su incidencia en las mujeres con mastitis se sitúa entre el 3 y el 11% (Amir *et al.*, 2004). Esta seria complicación conduce frecuentemente al abandono de la lactancia y representa un gasto sanitario significativo (Branch-Elliman *et al.*, 2013). Los factores de riesgo que se han asociado con el desarrollo de abscesos mamarios son las dificultades durante el inicio de la lactancia, una historia de mastitis en lactancias previas, el hecho de ser primípara mayor de 30 años y un cese abrupto de la lactancia materna (Dixon y Khan, 2011; Cusack y Brennan, 2011).

*S. aureus* es el principal agente etiológico implicado en los abscesos (Moazzez *et al.*, 2007; Stafford *et al.*, 2008; Branch-Elliman *et al.*, 2012), con un elevado número de cepas (mayor del 50%) resistentes a la meticilina (Moazzez *et al.*, 2007; Berens *et al.*, 2010; Branch-Elliman *et al.*, 2012). *S. epidermidis* y otros ECN también aparecen en algunos casos de abscesos (Moazzez *et al.*, 2007). El género *Corynebacterium*, que como se ha descrito en el capítulo anterior está implicado en la mastitis granulomatosa, es responsable de abscesos previos a la aparición de un granuloma (Riegel *et al.*, 2004; Ang y Brown, 2007; Le Flèche-Matéos *et al.*, 2012).



**Figura 17.** Representación esquemática de la etiopatogenia de las mastitis humanas, una disbiosis del epitelio mamario. Epitelio mamario en condiciones fisiológicas (A) y durante las mastitis (B). Las flechas rojas indican el aumento de presión de la leche al pasar por una luz disminuida. Esta presión sobre una zona inflamada es la responsable del dolor punzante, los calambres y/o la sensación de quemazón. Fuente: Delgado *et al.* (2009a).

La presencia de un absceso produce un dolor que suele ser más intenso que en las mastitis, con signos externos muy evidentes ya que la piel de la zona suele estar enrojecida, caliente, turgente y descamada, observándose en muchos casos una evidente deformación del pecho y la presencia de fiebre elevada (Boutet, 2012).

Las técnicas de imagen que se emplean habitualmente para explorar el pecho (ecografía, mamografía) no diferencian una glándula mamaria sana de una con mastitis, ya que se obtiene una imagen muy similar en ambos casos. Sin embargo, sí permiten el diagnóstico de un absceso debido al tejido conjuntivo característico de este tipo de estructuras. En este sentido, la imagen de un absceso que se obtiene mediante ecografía suele ser inequívoca (Ulitzsch *et al.*, 2004; Boisserie-Lacroix *et al.*, 2012). En cualquier caso, el único tratamiento de un absceso es el abordaje quirúrgico o el drenaje guiado por ecografía (Ulitzsch *et al.*, 2004; Cusack y Brennan, 2011; Kataria *et al.*, 2013).

### **II.3.3. AGENTES ETIOLÓGICOS CAUSANTES DE MASTITIS INFECCIOSAS**

Resulta sorprendente la escasez de estudios microbiológicos sobre mastitis humanas a pesar de que en la mayoría de los casos tienen una etiología infecciosa. En 2002, Foxman *et al.* publicaron uno de los estudios más amplios sobre mastitis infecciosas durante la lactancia realizados hasta la fecha y, aunque se contempló hasta el más remoto factor predisponente, no se investigaron los agentes etiológicos implicados en cada caso. Estos mismos autores reconocían esa importante laguna en el conocimiento de las mastitis humanas y reclamaron la atención del mundo científico hacia este tema debido a su fuerte impacto sanitario y social. Más de una década después, el número de estudios microbiológicos sobre la mastitis infecciosa en la especie humana es todavía muy escaso y el papel que juegan muchos agentes etiológicos aún se desconoce.

#### **II.3.3.1. El género *Staphylococcus* y otros relacionados (*Rothia*, *Kocuria*)**

Los principales agentes etiológicos de las mastitis infecciosas pertenecen al género *Staphylococcus* (WHO, 2000; Barbosa-Cesnik *et al.*, 2003; Lawrence y Lawrence, 2011; Fernández y Rodríguez, 2014). Entre ellos, *S. aureus* (Figura 16B) ha sido considerada tradicionalmente como el prototipo de especie causante de mastitis (Reddy *et al.*, 2007; Stafford *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2011). Esta especie, como se ha explicado previamente (apartado II.3.2.1.1), suele ser responsable de las mastitis agudas que cursan con una sintomatología muy evidente, tanto a nivel local como sistémico y que pueden derivar en la formación de abscesos (Berens *et al.*, 2010; Branch-Elliman *et al.*, 2013). En los últimos años, se ha puesto de manifiesto que los ECN, con *S. epidermidis* a la cabeza (Figura 16D), relacionados normalmente con mastitis subagudas y subclínicas, constituyen la primera causa de mastitis en términos cuantitativos. Este hecho se ha observado reiteradamente en la mastitis bovina y en otras especies animales, en las que estos microorganismos se han descrito como importantes patógenos emergentes de estos procesos infecciosos (Pyörälä y Taponen, 2009; Contreras y Rodríguez, 2011; Onni *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011; Björk *et al.*, 2014), situación que parece similar en las mastitis humanas (Bakhshandeh-Nosrat *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009b; Contreras y Rodríguez, 2011). De hecho, se

ha sugerido que las cepas de *S. epidermidis* que causan mastitis en vacas tienen origen humano, ya que el vacuno no constituye un hospedador natural de esta especie, que suele estar ausente o ser muy rara en la piel o mucosas bovinas (Thorberg *et al.*, 2006; Savijoki *et al.*, 2014).

*S. epidermidis* es un microorganismo comensal de la piel y las mucosas de hospedadores sanos, sin embargo, ha desarrollado estrategias para desenvolverse como un relevante patógeno (Schoenfelder *et al.*, 2010; Otto, 2012; Otto, 2014). De hecho, su creciente incidencia como causa de infecciones nosocomiales ya se ha reconocido en Medicina Humana, unida al uso extensivo de dispositivos tales como catéteres o prótesis en la práctica clínica (Piette y Verschraegen, 2009; Becker *et al.*, 2014; Namvar *et al.*, 2014). En este sentido, su capacidad para formar *biofilms* junto con el desarrollo de multirresistencias a antibióticos suponen mecanismos clave relacionados con la emergencia de *S. epidermidis* como patógeno oportunista (Fey y Olson, 2010; Sahal y Bilkay, 2014; Wojtyczka *et al.*, 2014; Büttner *et al.*, 2015). Las cepas de *S. epidermidis* implicadas en mastitis suelen compartir también las propiedades mencionadas: resistencia a antibióticos de relevancia clínica y capacidad para formar *biofilms* en los epitelios (Melchior *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2009b). No hay que olvidar que las infecciones producidas por este microorganismo suelen estar asociadas al uso de catéteres y sistemas de drenaje y que, precisamente, la glándula mamaria durante el final del embarazo y la lactancia constituye un sistema de drenaje extremadamente complejo. Por otra parte, recientemente se ha observado que algunos ECN poseen potencial enterotoxigénico y se ha sugerido que este hecho podría ser un factor relevante en la patogenia de las infecciones humanas y animales, tales como las mastitis bovinas (Podkowik *et al.*, 2013).

El género *Staphylococcus*, que actualmente se integra en la familia *Staphylococcaceae*, formó parte en el pasado de la familia *Micrococcaceae*, en la que se incluyen algunos géneros estrechamente relacionados con los estafilococos, como *Rothia* y *Kocuria*. Estos géneros contienen especies que podrían actuar como agentes causales de mastitis pero, debido a los grandes cambios taxonómicos sufridos por el grupo en los últimos años, han podido pasar desapercibidos o ser incorrectamente identificados hasta la fecha, a pesar de haber sido aislados en algunos estudios sobre mastitis humanas (Delgado *et al.*, 2008, Arroyo *et al.*, 2010).

El género *Rothia* (conocido como *Stomatococcus* hasta el año 2000) incluye dos especies, *Rothia dentocariosa* y *Rothia mucilaginosa*, que forman parte de la microbiota de la cavidad oral y el tracto respiratorio. No obstante, en los últimos años, ambas se han descrito como agentes emergentes de bacteriemias, endocarditis, infecciones del sistema nervioso central, infecciones urinarias, osteomielitis y peritonitis, especialmente en personas inmunocomprometidas (Morris *et al.*, 2004; Faiad *et al.*, 2011; Bruminhent *et al.*, 2013; Ramanan *et al.*, 2014). Algo similar ocurre con las especies del género *Kocuria*, previamente clasificadas dentro del género *Micrococcus* (Stackebrandt *et al.*,



1995), que comparten los mismos hábitats que *Rothia* en el hospedador humano. Dos de ellas (*Kocuria rosea* y *Kocuria kristinae*) se consideran potencialmente patógenas y, en tales casos, suelen estar asociadas a bacteriemias derivadas del uso de catéteres y a colecistitis agudas (Ma *et al.*, 2005; Savini *et al.*, 2010; Dunn *et al.*, 2011; Purty *et al.*, 2013), como también ocurre en la especie *R. mucilaginosa* (Ramanan *et al.*, 2014). Este aspecto es significativo ya que muestra la capacidad de estas especies para provocar infecciones en el interior de conductos, algo necesario para el desarrollo de mastitis. Asimismo, este hecho también podría estar relacionado con el aumento de la resistencia a antibióticos que se observa en las infecciones bacterianas asociadas a la presencia de *biofilms* (Dunn *et al.*, 2011; Lai *et al.*, 2011; Ramanan *et al.*, 2014).

### II.3.3.2. El género *Streptococcus*

El segundo grupo bacteriano implicado en estos procesos infecciosos es el de los estreptococos ya que, o bien solos o en compañía de estafilococos o corinebacterias, se encuentran en, al menos, un 10–35% de los cuadros de mastitis, normalmente de tipo subagudo o subclínico (WHO, 2000; Delgado *et al.*, 2009a; Contreras y Rodríguez, 2011; Fernández y Rodríguez, 2014).

Las especies del género *Streptococcus* implicadas en mastitis parecen ser diferentes según la especie animal. *St. agalactiae*, *St. uberis* y *St. dysgalactiae* son agentes etiológicos frecuentes de mastitis en ganado bovino, pero no están relacionadas (o muy raramente) con las mastitis humanas (Keefe, 1997; Contreras y Rodríguez, 2011). Si bien algunos casos de sepsis neonatal tardía por *St. agalactiae* se han asociado con su transmisión a través de leche materna, en las madres lactantes no se apreciaron síntomas de mastitis (Filleron *et al.*, 2014). Por otra parte, *St. agalactiae* se encuentra raramente presente en leche humana (Le Doare y Kampmann, 2014) y se identifica fácilmente con los métodos que se emplean rutinariamente en los laboratorios de microbiología, como ocurre con *St. pyogenes* y *St. mutans*, otros importantes estreptococos patógenos implicados en infecciones invasivas (Krzysciak *et al.*, 2013).

Los estreptococos causantes de mastitis humanas pertenecen principalmente al grupo *viridans* (EGV) (Figura 16E), un grupo heterogéneo de microorganismos que incluye tanto a especies generalmente comensales de los tractos respiratorio y digestivo, como a *St. pneumoniae*, uno de los patógenos humanos más importantes (Doern y Burnham, 2010). Debido a su alta prevalencia como comensales, los EGV se han considerado frecuentemente especies contaminantes en una muestra clínica. En consecuencia, su papel como agentes etiológicos de la mastitis humana se ha infravalorado hasta la fecha. En este sentido, es necesaria una identificación precisa de las distintas especies incluidas entre los EGV para proporcionar un mayor conocimiento sobre su patogenicidad y su resistencia a antibióticos (Bruckner y Gigliotti, 2006; Doern y Burnham, 2010).

El género *Streptococcus* es particularmente dinámico desde un punto de vista taxonómico y en los últimos años se han descrito nuevas especies y géneros estrechamente relacionados, por lo que su papel en las mastitis humanas debería ser cuidadosamente reevaluado y, en este sentido, la correcta identificación de algunas especies constituye uno de los mayores retos actuales en el diagnóstico de las mastitis infecciosas humanas.

### II.3.3.3 El género *Corynebacterium*

Diversas especies del género *Corynebacterium* están implicadas en infecciones humanas, desde las clásicas *C. diphtheriae* y *C. jeikeium* hasta muchas otras (*C. striatum*, *C. xerosis*, *C. minutissimum*, *C. urealyticum*, *C. amycolatum*) que se han relacionado con diferentes cuadros clínicos como endocarditis, septicemia, meningitis, infecciones de heridas y del tracto urinario (Funke *et al.*, 1997; Fernández Natal, 2001; Ortiz-Perez, 2009; Bernard, 2012).

La dificultad para la identificación de las corinebacterias puede haber motivado que hayan pasado desapercibidas en muchos casos. No obstante, los avances técnicos en la caracterización fenotípica y genotípica de las distintas especies del género *Corynebacterium* aisladas de muestras clínicas han ido paralelos a su reconocimiento en la actualidad como patógenos oportunistas y su implicación en patologías infecciosas muy diversas (Bernard, 2012). Asimismo, diversos estudios han puesto de manifiesto las elevadas tasas de resistencias a antibióticos de muchas especies de relevancia clínica, lo que puede tener importantes implicaciones terapéuticas (Ortiz-Perez, 2009; Ortiz-Perez *et al.*, 2010; Hinić *et al.*, 2012; Olender, 2013; Verroken *et al.*, 2014).

El género *Corynebacterium* (Figura 16G) constituye un agente etiológico común de la mastitis en rumiantes (Contreras y Rodríguez, 2011). Sin embargo, este grupo bacteriano siempre ha estado relegado como causa de mastitis humana, a pesar de que cada vez parece más relevante, pudiendo representar el tercer grupo mayoritario en las mastitis subagudas y el primero en las mastitis granulomatosas; y, en ambos casos, con tendencia a las recurrencias, a la cronificación y a los procesos supurativos. Aunque no se conoce con exactitud ni la etiología ni la patogénesis de la mastitis granulomatosa, se ha sugerido que hay una progresión desde una mastitis subclínica a una mastitis subaguda y finalmente a la formación de un granuloma (Riegel *et al.*, 2004).

La especie *C. kroppenstedtii*, principal causa de mastitis granulomatosas, fue descrita por primera vez a partir de un aislado obtenido del esputo de una mujer con una infección respiratoria (Collins *et al.*, 1998). Esta especie se caracteriza por la ausencia de ácido micólico en su pared celular y la producción de una neuraminidasa que podría actuar como factor de virulencia. Además, se diferencia de otras corinebacterias por su carácter lipofílico, una propiedad particularmente relevante en la patogenia de este tipo de mastitis. De hecho, su lipofilia le permite crecer firmemente adherido a los glóbulos

de grasa, lo que le proporciona acceso a una abundantísima fuente exógena de ácidos grasos. El hecho de que estas bacterias afecten especialmente a mujeres en edad fértil, entre algunos meses y pocos años después de haber tenido un hijo, sugiere que su sobrecrecimiento puede estar estrechamente ligado a la gran disponibilidad de ácidos grasos durante la lactancia. Dado que los granulomas se desarrollan lentamente, el cuadro puede aparecer incluso meses después de que haya finalizado la lactancia (Ang y Brown, 2007; Stary *et al.*, 2011).

#### II.3.3.4. Otros microorganismos

La implicación de diversas enterobacterias, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* o *Enterobacter* spp., en mastitis humanas es poco frecuente, a diferencia de lo que sucede en otras especies de mamíferos (Contreras y Rodríguez, 2011). Excepcionalmente, se han identificado especies como *Salmonella typhi* o *Salmonella paratyphi* como causantes de mastitis y abscesos mamarios, pero estos casos no tuvieron lugar durante la lactancia (Kushwaha *et al.*, 2002).

*Mycobacterium tuberculosis* es otra causa poco habitual de mastitis y abscesos (Singh *et al.*, 2011; Tauro *et al.*, 2011; Marinopoulos *et al.*, 2012; Chowdhury *et al.*, 2015a; Sabageh *et al.*, 2015). Generalmente, origina granulomas similares a los de las mastitis granulomatosas por corinebacterias y, al igual que éstas, se pueden asemejar a un cáncer de mama, por lo que el diagnóstico siempre debe ser histológico y microbiológico (Tewari y Shukla, 2005).

La incidencia de la tuberculosis mamaria oscila entre el 0,1% de los países desarrollados y el 3-4% en las regiones endémicas como África e India, pero en la actualidad está aumentando en todo el mundo, principalmente por los movimientos masivos de población inmigrante. En consecuencia, la tuberculosis mamaria puede adquirir cierta relevancia en un futuro próximo en países desarrollados (Marinopoulos *et al.*, 2012).

*Candida albicans* se ha considerado tradicionalmente una de las principales causas de mastitis o de dolor en los pezones y esta creencia sigue aún arraigada entre el personal sanitario que atiende a mujeres con problemas durante la lactancia (Delgado *et al.*, 2009a; Fernández y Rodríguez, 2014). En consecuencia, muchas de estas mujeres son tratadas con antifúngicos orales o tópicos durante un tiempo prolongado sin mejoría o incluso con un empeoramiento del cuadro clínico (Carmichael y Dixon, 2002; Eglash y Proctor, 2007). En este sentido, la medicación antifúngica se ha descrito como factor de riesgo de mastitis en algunos estudios epidemiológicos (Foxman *et al.*, 2002).

*C. albicans* es el agente causal de la candidiasis oral (*muguet*) en niños y de la candidiasis vaginal en mujeres y, además, puede causar infecciones graves en niños prematuros y en personas diabéticas o inmunodeprimidas (Jain *et al.*, 2010; Hani *et al.*,

2015). Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con estafilococos y estreptococos, la glándula mamaria no es precisamente un ecosistema adecuado para su crecimiento. De hecho, el aislamiento de levaduras en casos de mastitis es muy raro cuando las muestras se recogen por expresión manual y en condiciones higiénicas, y, cuando sucede, las levaduras aisladas no suelen pertenecer a la especie *C. albicans* (como ocurre en los casos de *muguet* o candidiasis vaginal), sino a especies como *C. parapsilosis* o *Saccharomyces cerevisiae* (Delgado *et al.*, 2009a).

Tradicionalmente, el diagnóstico de candidiasis mamaria se ha realizado mediante la inspección visual del pecho, sin ninguna evidencia microbiológica para llegar a tal diagnóstico (Carmichael y Dixon, 2002; Hale *et al.*, 2009). No obstante, es importante destacar que el diagnóstico incorrecto de candidiasis mamaria posiblemente se debe a la asociación, en un pequeño porcentaje de casos, entre una mastitis estafilocócica o estreptocócica en la madre y una candidiasis oral en el lactante, ya que estas bacterias al crecer secretan productos metabólicos que las levaduras utilizan como fuente de carbono. De este modo, *C. albicans* y los estafilococos/estreptococos establecen una asociación sinérgica en la que las bacterias promueven el crecimiento de las levaduras y ambos se coagregan dando lugar a la formación de biopelículas complejas (Harriot y Noverr, 2009; Shirtliff *et al.*, 2009; Morales y Hogan, 2010; Beaussart *et al.*, 2013).

En consecuencia, durante una mastitis estafilocócica o estreptocócica, la concentración de estos microorganismos en la leche es superior a la normal, lo que hace que la especie *C. albicans*, habitualmente presente en la cavidad oral del niño a baja concentración, prolifere en exceso. Obviamente, un lactante con *muguet* transfiere levaduras a la piel del pecho de la madre, lo que explica que en la leche de estas mujeres se pueda detectar una pequeña concentración de levaduras, a las que muchas veces se atribuye de forma errónea ser las causantes de mastitis (Delgado *et al.*, 2009a). Desafortunadamente, en varios estudios en los que se ha aislado *C. albicans* de madres y de sus hijos lactantes no se ha contemplado la posible asociación entre los estreptococos/estafilococos de la madre y la presencia de *C. albicans* en el hijo (Andrews *et al.*, 2007; Morril *et al.*, 2005). Sin duda éste es un aspecto de interés para futuros estudios sobre la microbiología de las mastitis humanas.

#### II.3.4. DIAGNÓSTICO DE LAS MASTITIS

Tradicionalmente se había considerado que la leche humana era estéril mientras se encontraba dentro de la glándula mamaria. Sin embargo, actualmente se sabe que constituye una fuente de bacterias para el intestino infantil siendo uno de los factores clave en la iniciación y el desarrollo de la microbiota intestinal del neonatos (Rodríguez *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2013; Chassard *et al.*, 2014; Latuga *et al.*, 2014; Jost *et al.*, 2015). Todo parece indicar que, al menos una parte de estas bacterias, no procede de la contaminación a partir del contacto con la piel, sino que constituyen una auténtica

microbiota mamaria, que se empieza a formar durante el último tercio del embarazo y que desaparece tras el destete (Fernández *et al.*, 2013).

Como se ha descrito en el apartado II.2.1, en condiciones fisiológicas los cultivos de leche se caracterizan, cualitativamente, por la presencia de una población relativamente heterogénea, dominada por estafilococos, estreptococos, bifidobacterias, bacterias lácticas y algunas otras bacterias Gram-positivas; todas ellas parecen desempeñar funciones importantes para la homeostasis mamaria y del lactante.

Desde un punto de vista cuantitativo, la concentración bacteriana en leche fresca obtenida de una mujer sana (y en las condiciones que se comentarán posteriormente en el apartado II.3.4.4) es muy moderada y habitualmente se sitúa en torno a 100–300 UFC/mL, aunque en algunos casos se pueden alcanzar valores de hasta aproximadamente 1.000 UFC/mL (Jost *et al.*, 2015). Sin embargo, hay ciertas circunstancias que pueden conducir a una disbiosis de la microbiota normal de la glándula mamaria, con un aumento notable y rápido de la concentración de los agentes causales de mastitis (habitualmente estafilococos y estreptococos) y la progresiva desaparición del resto de las bacterias que habitan en la leche de forma fisiológica (lactobacilos, lactococos, enterococos, bifidobacterias, etc.), mediante procesos de exclusión competitiva (Delgado *et al.*, 2008; Contreras y Rodríguez, 2011). Esta alteración conduce a la inflamación y posterior obstrucción de los conductos galactóforos, dando lugar a una mastitis (Delgado *et al.*, 2009a; Jiménez *et al.*, 2009; Fernández y Rodríguez, 2014).

#### **II.3.4.1. Diagnóstico clínico**

Como se ha descrito anteriormente (apartado II.3.2), ciertas mastitis (agudas, granulomatosas) provocan la aparición de síntomas clínicos evidentes e incluso derivan en un absceso. En consecuencia, son fáciles de diagnosticar en la consulta médica mediante una exploración física. Sin embargo, el diagnóstico de las mastitis subagudas y, especialmente, las subclínicas es mucho más difícil mediante un examen visual y, en general, se suelen infradiagnosticar (Delgado *et al.*, 2009a; Carrera *et al.*, 2012; Fernández y Rodríguez, 2014). La sintomatología más representativa de los distintos tipos de mastitis se resume en la Tabla 10.

#### **II.3.4.2. Diagnóstico de laboratorio**

Además del diagnóstico microbiológico, que se tratará en profundidad en los apartados II.3.4.3 y II.3.4.4, en Veterinaria se han empleado diversos indicadores de inflamación para el diagnóstico de mastitis, a partir de muestras de leche, especialmente cuando es subclínica y los síntomas no son evidentes. Entre ellos destacan el recuento de células somáticas por varias técnicas (el método estándar es el recuento microscópico directo de estas células en una muestra de leche), la determinación del pH, la medida de

la conductividad eléctrica debida al aumento de la concentración de ciertos electrolitos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), la cuantificación de la actividad *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa o la de las proteínas de fase aguda (Pyörälä, 2003; Viguier *et al.*, 2009; Olechnowicz y Jaśkowski, 2012). La termografía, a diferencia de otras técnicas de imagen (ecografía, mamografía), puede resultar útil ya que detecta los cambios de temperatura característicos de las zonas inflamadas y permite un seguimiento sencillo y rápido de la evolución del proceso (Hovinen *et al.*, 2008). El examen microscópico de la muestra de leche para hacer un recuento diferencial de células inflamatorias también puede resultar útil para determinar de una forma rápida si hay una infección (Pilla *et al.*, 2012). Sin

**Tabla 10.** Tipos de mastitis, agentes etiológicos y sintomatología más representativa

<b>Tipo</b>	<b>Principales agentes etiológicos</b>	<b>Sintomatología*</b>
<b>Agudas</b>	<i>S. aureus</i>	Enrojecimiento y dolor Aumento del tamaño pecho Zonas de induración Disminución de la secreción de leche Síntomas similares a gripe (fiebre, dolores musculares, dolores articulares, escalofríos) Abscesos
<b>Subagudas</b>	<i>S. epidermidis</i> <i>St. mitis</i> <i>St. salivarius</i> <i>Rothia</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp.	Dolor en el pecho (pinchazos, calambres, sensación de quemazón) Zonas de induración Disminución de la secreción de leche Raramente se forman abscesos
<b>Granulomatosas</b>	<i>C. kroppenstedtii</i> Otras corinebacterias	Masas inflamatorias dolorosas Consistencia firme A veces con inflamación cutánea Pueden evolucionar hacia úlceras, abscesos, fístulas y/o supuraciones crónicas Deformación del pecho
<b>Subclínicas</b>	<i>S. epidermidis</i> <i>St. mitis</i> <i>St. salivarius</i> <i>Rothia</i> spp.	Ausencia de dolor Disminución de la secreción de leche

\*Todos los tipos de mastitis pueden ser recurrentes y pueden cursar con presencia o ausencia de grietas. Las mastitis subagudas pueden evolucionar a mastitis crónicas. Fuente: Carrera *et al.* (2012)

embargo, ninguno de estos parámetros se ha aplicado de forma rutinaria al diagnóstico y pronóstico de las mastitis humanas. Además, los valores de referencia en otras especies son de escaso valor ya que, en general, no son extrapolables entre las distintas especies de mamíferos (Zucali *et al.*, 2011, Jiménez-Granado *et al.*, 2014).

Las mastitis en otras especies, fundamentalmente la bovina, constituyen un área de investigación muy activa en Medicina Veterinaria debido a su impacto económico. Por ello, en los últimos años ha habido grandes avances en el desarrollo de técnicas inmunológicas y genéticas para su detección, que irán reemplazando progresivamente a los métodos convencionales a medida que se vayan validando (Viguier *et al.*, 2009). En este sentido, es importante aprender de la experiencia en Medicina Veterinaria e incorporar paulatinamente las técnicas desarrolladas en el campo de las mastitis bovinas al diagnóstico de las mastitis humanas.

#### **II.3.4.3. Diagnóstico microbiológico: indicación de realización**

La mastitis humana, como ya se ha señalado anteriormente, constituye un problema tan infravalorado como infradiagnosticado (Delgado *et al.*, 2009a; Jiménez *et al.*, 2009; Fernández y Rodríguez, 2014), hecho que se debe, por una parte, a que únicamente se suelen considerar como tales los casos agudos que cursan con una sintomatología evidente, como la inflamación y el enrojecimiento del pecho y la presencia de fiebre elevada. Asimismo, los casos en los que se realiza un cultivo de leche son verdaderamente excepcionales y, cuando se hacen, la recogida de la muestra y/o la interpretación de los resultados suele ser errónea. En este sentido, la falta de tradición en el análisis de leche humana, como medio para el diagnóstico de las mastitis, ha determinado la ausencia de protocolos estandarizados para la recolección de este tipo de muestras y de criterios para la interpretación de los resultados, a diferencia de lo que ocurre en Medicina Veterinaria dónde los cultivos se realizan rutinariamente (Sears y McCarthy 2003).

En tales circunstancias, el diagnóstico de “mastitis” en mujeres lactantes se suele basar en la inspección visual del pecho, lo que excluye habitualmente muchos casos de mastitis subagudas y subclínicas, que, como se ha mencionado anteriormente (apartados II.3.2 y II.3.3), constituyen la primera causa de mastitis en términos cuantitativos. Por otra parte, la posibilidad de un error en el diagnóstico es muy elevada y fomenta falsas creencias, como la de que una infección fúngica es responsable del amamantamiento doloroso (Carmichael y Dixon, 2002; Delgado *et al.*, 2009a; Hale *et al.*, 2009).

El hecho de que la etiopatogenia de la mastitis esté relacionada con un proceso de disbiosis (Delgado *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009a; Contreras y Rodríguez, 2011; Fernández y Rodríguez, 2014), avala que el análisis microbiológico de la leche sea el único medio posible para obtener un diagnóstico etiológico preciso y establecer un tratamiento eficaz (Arroyo *et al.*, 2010; Contreras y Rodríguez, 2011; Delgado *et al.*,

2008; Fernández y Rodríguez, 2014). Por lo tanto, estaría indicado realizar un diagnóstico microbiológico en las mujeres con un amamantamiento doloroso, independientemente de que sea unilateral o bilateral.

Es preciso resaltar que el cultivo de leche no sólo es esencial para el diagnóstico etiológico de una mastitis, sino clave para el éxito del abordaje terapéutico mediante la realización de los correspondientes antibiogramas. Cabe destacar, sorprendentemente, que ni la Organización Mundial de la Salud en su documento sobre las mastitis humanas (WHO, 2000), ni la *Academy of Breastfeeding Medicine* en su protocolo clínico sobre mastitis revisado recientemente (Amir y *Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee*, 2014) promueven que se realicen de forma rutinaria los análisis de leche materna ni las pruebas de susceptibilidad a antibióticos; sólo lo aconsejan en casos de falta de respuesta al tratamiento durante más de 2 días, así como en mastitis intrahospitalarias o mastitis recurrentes. Habitualmente, ante la falta de esta información, el tratamiento de las mastitis se instaura de forma empírica y suele consistir en la prescripción de antibióticos de amplio espectro (Carrera *et al.*, 2012), lo que ha conducido al incremento de las tasas de resistencia a antibióticos de los agentes etiológicos responsables y, en consecuencia, a que muchas mastitis deriven en una infección crónica o recurrente.

En conclusión, el tratamiento de las mastitis infecciosas debería instaurarse tras un análisis microbiológico que determine el agente causal y su sensibilidad a los antibióticos. Afortunadamente, la mastitis va recibiendo de forma paulatina una atención creciente en nuestro entorno (Delgado *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009a; Delgado *et al.*, 2011; Contreras y Rodríguez, 2011; Fernández y Rodríguez, 2014; Beltrán Vaquero *et al.*, 2015) y, en un futuro próximo, la implantación sistematizada de los cultivos de leche en los Servicios de Microbiología de los hospitales puede ofrecer una solución para un elevado porcentaje de casos. En este sentido, la posibilidad de realizar un diagnóstico microbiológico de las mastitis constituye una novedad para la mayor parte de laboratorios de microbiología clínica humana, pero su implantación progresiva responde a una demanda real.

#### **II.3.4.4. Protocolo para el diagnóstico microbiológico de las mastitis**

En 2011, Arroyo *et al.* publicaron una propuesta de protocolo para el diagnóstico microbiológico de las mastitis, que ha constituido una referencia clave en la elaboración del documento científico “*Diagnóstico microbiológico de la infección bacteriana asociada al parto y puerperio*” publicado recientemente por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) como Procedimiento en Microbiología Clínica (Delgado *et al.*, 2015). Dicho documento, también incluye un procedimiento normalizado de trabajo titulado “*Procesamiento microbiológico de la leche materna*”.



De acuerdo con la información recopilada en estos documentos, en el presente apartado de esta Tesis Doctoral se recogen de forma detallada los pasos a seguir para el diagnóstico microbiológico de las mastitis, desde la recogida, transporte y conservación de las muestras hasta su procesamiento, así como los criterios a seguir para la interpretación de los resultados.

#### ***II.3.4.4.1. Recogida, transporte y conservación de las muestras***

##### ***II.3.4.4.1.1. Recogida de las muestras***

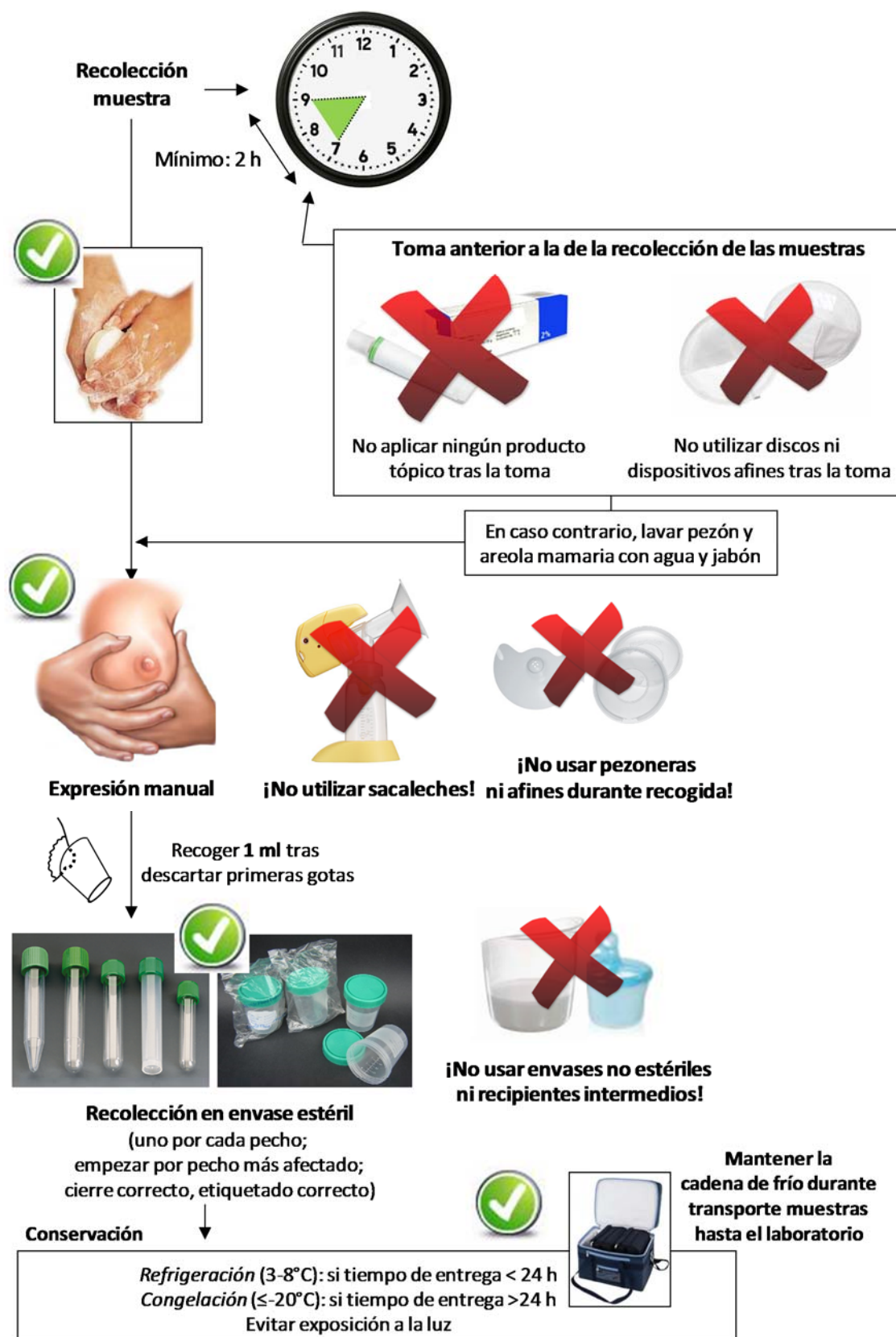
Una vez que el médico solicita un cultivo de leche materna, las instrucciones para la recogida de la muestra deben ser dadas de forma clara y sencilla por el personal sanitario encargado de la paciente, cerciorándose de la adecuada comprensión de las mismas. Sería deseable proporcionar a la paciente una hoja de instrucciones de recogida de muestras, para que ésta se realice de forma adecuada, evitando posibles contaminaciones con microorganismos ajenos a los que se encuentran en la leche materna. La Figura 18 presenta un esquema de los principales pasos a seguir para la recolección y conservación de muestras de leche destinadas a un análisis microbiológico.

La idoneidad de las muestras enviadas depende del cumplimiento de una serie de medidas referentes al procedimiento de obtención, cantidad enviada y transporte rápido y adecuado al laboratorio. En este sentido, se deben seguir las recomendaciones generales detalladas en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC “*Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología*” (Guerrero y Sánchez, 2003), teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- Siempre que las condiciones clínicas de la paciente lo permitan, las muestras se deben recoger antes de iniciar un tratamiento antimicrobiano.
- Las muestras se deben recoger inmediatamente antes de una toma y, si es posible, tras haber transcurrido al menos dos horas desde la toma anterior. El mejor momento para su recogida sería tras la primera toma de la mañana (entre las 6:00-9:00 am), para evitar fluctuaciones relacionadas con el ritmo circadiano.
- Desde la toma anterior a aquella en la que se vayan a recoger las muestras para el cultivo, no se debe aplicar ningún tipo de pomada o solución tópica (lanolina, antibióticos, antisépticos, antiinflamatorios, etc.). Tampoco se debe utilizar ningún tipo de accesorio (como pezoneras o conchas para lactancia) que provoque un acúmulo de leche en contacto directo con areolas mamarias y pezones. Si se han aplicado pomadas/soluciones tópicas o se han utilizado accesorios, se deben lavar areolas y pezones con agua templada y jabón neutro, y secarlos con una toalla limpia o una toallita de un solo uso inmediatamente antes de la recogida. En caso contrario, no sería necesaria la limpieza de la areola mamaria y el pezón antes de la recogida de

la leche, ya que este hecho no influye significativamente en la concentración bacteriana de la muestra.

- Inmediatamente antes de la recogida, la paciente debe lavarse las manos con agua caliente y jabón y secárselas con una toalla limpia o una toallita de un solo uso.
- Tras la estimulación previa del pecho mediante un masaje suave, la recogida de muestras de leche destinadas a un análisis microbiológico se debe efectuar mediante expresión manual, sin colocar ningún tipo de accesorio como pezoneras. Para realizar la extracción manual, se debe formar una “C” con el dedo pulgar por encima y el dedo índice por debajo, colocados a unos 4 cm del pezón. Posteriormente se empuja hacia la pared torácica sin separar los dedos y se rueda el pulgar y los otros dedos hacia el pezón, repitiendo este movimiento rítmicamente.
- En ningún caso se deben emplear bombas de lactancia (sacaleches) para extraer la leche que se va a analizar, ya que pueden ser una fuente importante de microorganismos ajenos a la glándula mamaria, que además suelen persistir tras la aplicación de los protocolos de limpieza y/o desinfección recomendados por los fabricantes debido a que forman películas biológicas muy persistentes (Boo *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2005; Marín *et al.*, 2009; Rasmussen y Geraghty, 2011). En consecuencia, su presencia puede enmascarar a los verdaderos agentes responsables de una mastitis. En general, los microorganismos contaminantes de las bombas suelen ser enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y levaduras, los cuales suelen estar ausentes o presentes en concentraciones muy bajas en la leche humana. Muchos de estos microorganismos son psicrotrofos, por lo que siguen proliferando durante la conservación de la leche en frío. Por otra parte, conviene recordar que el agua potable con la que se lavan o aclaran las bombas y otros accesorios suele contener cantidades relativamente elevadas de algunos de estos microorganismos (Szewzyk *et al.*, 2000).
- Las muestras de leche se deben recoger en envases estériles, de boca ancha, como los que se utilizan habitualmente para el análisis de muestras de orina o heces. Se deben descartar las primeras 4-5 gotas de leche. Hay que recoger una muestra de cada pecho (cada una en un envase independiente), empezando por el pecho que esté menos afectado en el momento de la recogida. Si los dos pechos están afectados por igual, el orden es indiferente. El recipiente se debe colocar debajo del pezón, dentro de la areola mamaria.
- Evitar tocar el interior del frasco o del tapón con los dedos, así como el contacto con cuerpos extraños.
- Nunca se deben utilizar recipientes intermedios (cucharas, biberones, vasos, botellas, etc.) para recoger la leche antes de transferirla al envase estéril.
- El volumen necesario para el cultivo de una muestra de leche es de 1 mL.
- Cerrar perfectamente el frasco para evitar que se derrame la muestra durante su transporte.



**Figura 18.** Esquema de los pasos a seguir para la recolección y conservación de muestras de leche destinadas a un análisis microbiológico. Fuente: Adaptado de Arroyo *et al.* (2011)

- Identificar el recipiente con una etiqueta en la que figure el nombre, apellidos, pecho del que procede la muestra, así como la fecha y hora de la recogida.

#### *II.3.4.4.1.2. Transporte y conservación de las muestras*

El transporte de las muestras al laboratorio se debe realizar lo antes posible. Si no se pueden enviar las muestras en las dos primeras horas tras su recogida, deben conservarse a temperatura de refrigeración (3–8 °C) hasta un máximo de 24 h. Si el tiempo de entrega de las muestras va a ser superior a 24 h, es preferible conservarlas en congelación ( $\leq -20$  °C). También se deben congelar si el transporte al laboratorio se retrasa más de 2 horas y no pueden conservarse en refrigeración.

Las muestras deben procesarse con rapidez a su llegada al laboratorio y podrían conservarse en refrigeración una vez procesadas durante un plazo máximo de 48 horas, por si fuera necesario confirmar los resultados obtenidos. Es esencial en cualquier caso no romper la cadena de frío durante su transporte y almacenamiento (Figura 18).

#### *II.3.4.4.2. Recepción de las muestras*

La recepción de la muestra consiste en determinar si cumple o no los requisitos de calidad necesarios para ser procesada. Los criterios para la aceptación y rechazo de las muestras deben establecerse claramente en cada laboratorio.

Durante la recepción de una muestra de leche hay que comprobar los siguientes aspectos:

- Las muestras han sido remitidas en recipientes estériles. En caso contrario no se admitirán, explicando a la paciente la necesidad de una esterilidad absoluta del recipiente de recogida para garantizar la calidad de los resultados emitidos.
- El tapón de rosca está perfectamente cerrado y no se ha derramado la muestra. En caso contrario no se admitirá la muestra explicando a la paciente la necesidad de una estanqueidad absoluta del recipiente para evitar la contaminación de la muestra y, así, garantizar la calidad de los resultados emitidos.
- Se debe valorar si hay una cantidad adecuada para el estudio solicitado y comprobar si las condiciones transporte y conservación han sido las adecuadas en cuanto al tiempo y la temperatura. En caso contrario se debe solicitar una nueva muestra.
- El frasco debe estar correctamente identificado mediante una etiqueta con un código adecuado o con el nombre/apellidos de la paciente, pecho (derecho o izquierdo) y fecha y hora de recogida. En caso contrario se solicitarán los datos necesarios.

- Se deberá comunicar al laboratorio cualquier otra información que sea imprescindible para la interpretación de los resultados, como el inicio de un tratamiento antimicrobiano previo a la toma de muestra.

Las consecuencias de una muestra mal tomada y/o mal enviada pueden suponer un fracaso en el aislamiento del agente etiológico o el aislamiento de posibles microorganismos contaminantes que pueden generar tratamientos innecesarios o inadecuados. El laboratorio de microbiología debe disponer de un sistema de registro de incidencias en el que figure la muestra implicada, la persona que realiza la recepción de la muestra, el tipo de incidencia y su resolución (si la muestra no se procesa o si finalmente se decide su procesamiento y en qué condiciones, etc.). En caso de rechazo, se informará detalladamente del motivo al facultativo responsable de la solicitud.

#### ***II.3.4.4.3. Procesamiento de las muestras***

Como se ha mencionado previamente, el cultivo de la leche es la técnica de elección para el diagnóstico de la infección mamaria durante la lactancia, ya que permite identificar y cuantificar a los agentes causales y estudiar su sensibilidad a los antibióticos. Asimismo, cuando el diagnóstico microbiológico de las mastitis se generalice en los laboratorios de microbiología clínica, podremos conocer la incidencia real de esta infección, hasta la fecha subestimada. El diagnóstico final debe sustentarse en dos pilares: el cultivo y la sintomatología clínica.

##### ***II.3.4.4.3.1. Medios de cultivo e inoculación***

El cultivo de las muestras debe cuantificar los microorganismos causales e identificarlos, al menos, a nivel de especie. El medio más adecuado para la siembra de muestras de leche materna con el fin de diagnosticar mastitis es el agar Columbia con ácido nalidíxico (CNA), que permite el crecimiento simultáneo de la mayoría de las especies causantes de mastitis (estafilococos, estreptococos, corinebacterias, etc.). El medio agar MacConkey (MCK) para el aislamiento de enterobacterias y el agar Sabouraud Dextrosa con Cloranfenicol (SDC) para aislamiento de levaduras, se pueden utilizar adicionalmente para comprobar que no ha habido contaminación de las muestras.

La siembra de las muestras se realizará mediante inoculación directa (10-50 µl) en los medios de cultivo mencionados. En principio, cualquier técnica de siembra de muestras biológicas que permita la cuantificación de los microorganismos es aplicable a las muestras de leche; desde la técnica de siembra con asa calibrada en forma de estría en abanico y después por agotamiento, hasta los sistemas semiautomáticos de siembra en espiral. Es importante tener en cuenta que para obtener un recuento cuantitativo la leche debe ser previamente homogeneizada, moviendo la muestra con suavidad para

evitar la formación de espuma. Por otra parte, la siembra de más de una muestra de leche por placa no es un procedimiento aceptable por la posibilidad de contaminación

#### *II.3.4.4.3.2. Condiciones de incubación de los cultivos*

Las placas sembradas se deben incubar a 35-37 °C en atmósfera aerobia, con la placa en posición invertida. La mayoría de bacterias causantes de infección mamaria se desarrollan en la placa en 18-24 horas, pero conviene realizar la lectura de resultados a las 48 horas por la posibilidad de que se trate de bacterias exigentes o cultivo negativo. Asimismo, un periodo de incubación de 48 horas permite apreciar mejor las características de las colonias en las placas.

#### *II.3.4.4.3.3. Lectura de los cultivos*

Si las placas no presentan crecimiento después del tiempo adecuado de incubación, el cultivo debe considerarse como negativo. No obstante, este hecho puede deberse a la antibioterapia aplicada previamente a la recogida de las muestras o a que las bacterias están presentes en una concentración inferior al límite de detección de la técnica utilizada. En cualquier caso, tanto si no hay crecimiento en la placa como si las colonias que aparecen son muy pequeñas, debe prolongarse la incubación otras 24 o 48 horas para su posterior valoración.

Si el cultivo presenta crecimiento es importante discriminar entre especies causantes de mastitis (*S. aureus*, *S. epidermidis* y otros ECN, *Rothia* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., entre otras) de aquellas especies que pueden formar parte de la microbiota mamaria y que no causan mastitis (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis* y otras bacterias lácticas, así como *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium* spp., etc.). Por otra parte, es necesario tener en cuenta la posible presencia de microorganismos que pueden proceder de la manipulación o lavado de dispositivos empleados para la recogida de la leche (*Enterobacteriaceae*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp, levaduras, etc.) que no se considerarán valorables, aunque por supuesto, siempre deben considerarse en el contexto clínico del paciente.

Al realizar la lectura de las placas se debe valorar las diferentes morfologías bacterianas y realizar el recuento de colonias para cada una de las posibles especies por separado, expresando el resultado en UFC/mL. Las principales técnicas de identificación bacteriana se contemplan en el siguiente apartado.

#### *II.3.4.4.4. Métodos de identificación microbiana*

La metodología que se usa de manera general en el laboratorio de microbiología clínica para la identificación de un agente infeccioso se detalla en el Procedimiento de la

SEIMC “*Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología*” (Bou *et al.*, 2010). Las técnicas que se exponen en este procedimiento se pueden aplicar a la identificación de los microorganismos responsables de la mastitis, aspecto esencial para conocer la evolución clínica del proceso y aplicar una terapia antimicrobiana eficaz. En el contexto del documento científico mencionado, en este apartado se presentan de manera concisa las principales técnicas de identificación bacteriana.

#### *II.3.4.4.4.1. Métodos fenotípicos*

En un laboratorio de microbiología clínica es habitual que la identificación bacteriana se realice por medio de métodos convencionales basados en las características fenotípicas, ya que su sencillez y coste los hace más asequibles (Winn *et al.*, 2006; García, 2010). Los esquemas tradicionales de identificación fenotípica bacteriana se basan en las características «observables» de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas.

En el proceso de identificación bacteriana tradicional, la experiencia del microbiólogo es fundamental para la elección de una prueba o una batería de pruebas de forma secuencial en función de la fiabilidad de las mismas, del género o de la especie bacteriana que se pretende identificar, del origen del aislado bacteriano, así como del coste de las mismas.

Tras la siembra en medios de cultivo adecuados que nos indican requisitos de crecimiento en relación a atmósfera, temperatura y nutrición, los aislados se someten a una batería de pruebas entre las que se incluyen: 1) observación de las características microscópicas en fresco y tras la tinción, que revelan la manera de agruparse, la estructura de las células y su tamaño; 2) observación de las características macroscópicas como la morfología y la hemólisis y 3) pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias objeto de identificación (MacFaddin, 2000).

Entre las pruebas bioquímicas destacan a) pruebas que se utilizan en la identificación preliminar y con lectura inmediata como la catalasa y oxidasa; b) pruebas con lectura en menos de 6 h (hidrólisis del hipurato,  $\beta$ -galactosidasa-ONPG, aminopeptidasas, ureasa e indol; c) pruebas con lectura de 18 a 48 h que incluirían la óxido-fermentación, reducción de nitratos, rojo de metilo, Voges-Proskauer, agar hierro de Kligler, fermentación de azúcares, hidrólisis de la esculina, coagulasa, fenilalanina-desaminasa, DNasa, hidrólisis de la gelatina, decarboxilasas, lipasa, lecitinasa, utilización de citratos, utilización de malonato, y prueba de CAMP (abreviatura de Christie, Atkins, and Munch-Peterson), entre las más frecuentes; y d) pruebas basadas en la resistencia a ciertas sustancias como la optoquina o bacitracina, así como la solubilidad en bilis y crecimiento en caldo hipersalino.

Hay que destacar que existen en el mercado numerosos sistemas multipuebas con el fin de conseguir una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias. Todos ellos exigen unas condiciones muy precisas de concentración del inóculo, incubación y lectura, que si no se observan pueden dar lugar a importantes errores. Estos sistemas pueden ser manuales y automatizados. Los *sistemas multipuebas manuales* están diseñados como galerías de celdillas aisladas con sustrato liofilizado que se inoculan individualmente y permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas bioquímicas [API (bioMérieux), Enterotube (BBL), Oxi/Ferm Tube (BD), RapID systems y MicroID (Remel)]. Los *sistemas multipuebas automatizados* (MicroScan, Vitek, ATB, Pasco, Wider, Phoenix, etc.) son galerías semejantes a las descritas, pero cuya inoculación, incubación y lectura se efectúan de modo automatizado. También hay paneles en los que además de encontrarse los sustratos para el desarrollo de pruebas bioquímicas, se encuentran diversos antimicrobianos a distintas concentraciones, con lo que se realiza simultáneamente la identificación y antibiograma del microorganismo objeto de estudio.

Los métodos fenotípicos son bien conocidos en los laboratorios de microbiología, y aunque en el pasado se han practicado de manera rutinaria, actualmente están siendo sustituidos por otros métodos ya que no proporcionan certeza taxonómica y muestran algunas limitaciones importantes entre las que destacan: 1) no todas las cepas de una misma especie muestran una característica específica; 2) una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos; y 3) ausencia de bases de datos actualizadas para algunas especies en un determinado sistema de identificación. Estas limitaciones se observan de manera más evidente para ciertos microorganismos, como es el caso de algunas especies estrechamente relacionadas del grupo de los estreptococos *viridans* (Ikryannikova *et al.*, 2011; Teles *et al.*, 2011).

#### II.3.4.4.2 Métodos moleculares

Los métodos moleculares permiten soslayar algunas de las limitaciones de los métodos fenotípicos, si bien su implementación no es universal en todos los laboratorios, debido a su coste y al grado de especialización que se requiere para su aplicación, por lo que dichos métodos suelen estar centralizados en laboratorios o centros de referencia (Ieven, 2000; Wolk *et al.*, 2001; Sibley *et al.*, 2012). No obstante, cada vez son más los servicios de microbiología hospitalarios que cuentan con ellos para el análisis rutinario de muestras biológicas.

Una amplia variedad de genes han sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos en los distintos géneros y especies bacterianas, siendo el análisis de la secuencia génica del 16S rRNA la herramienta más ampliamente utilizada (Clarridge, 2004; Woo *et al.*, 2008). Sin embargo, la alta homología genética presente en determinados géneros bacterianos o los cambios en la asignación taxonómica de ciertas especies, impiden en ocasiones una identificación a nivel de especie y, a veces, incluso de género sobre la base del 16S rRNA. En estos casos, se puede recurrir a otros



genes dianas para realizar la asignación de especie, como el espacio intergénico 16S-23S rRNA (Shang *et al.*, 2003), la subunidad b de la RNA polimerasa (*rpoB*) (Adékambi *et al.*, 2009) o la subunidad  $\beta$  de la DNA girasa (*gyrB*) (Itoh *et al.*, 2006).

Las técnicas de identificación molecular basadas en el 16S rRNA o los otros genes mencionados, implican la amplificación y posterior secuenciación de esos genes o sus fragmentos. Tras la secuenciación del amplicón, la secuencia se introduce en bases de datos *online* para identificar la del aislado mediante comparación con otras secuencias depositadas en las bases. Actualmente, la base de datos más consultada es GenBank del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), que requiere el empleo de programas como BLAST (del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para el alineamiento de secuencias. Asimismo, GenBank contiene una sección de taxonomía (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>) que incluye información precisa sobre la clasificación y nomenclatura de todos los microorganismos incluidos en la base.

Las técnicas moleculares adquieren especial relevancia cuando se trata de identificar bacterias difíciles de cultivar, especies con escasa descripción, baja frecuencia de aislamiento o fenotípicamente atípica. Sin embargo, en ocasiones no permiten una correcta asignación de género y especie debido a diversos problemas como la baja calidad de las secuencias depositadas en la base de datos o la escasa resolución filogenética para la discriminación de algunos géneros y especies.

En el caso de la mastitis bovina, la disponibilidad del genoma de diversas cepas de las principales especies implicadas en esta patología (Kant *et al.*, 2015) posibilita el desarrollo de técnicas moleculares para su identificación. Se han propuesto algunos ensayos de identificación basados en la aplicación de la PCR múltiple o de la PCR cuantitativa en tiempo real directamente sobre muestras de leche, sin la necesidad de un cultivo previo (Phuektes *et al.*, 2003; Gillespie y Oliver, 2005; Koskinen *et al.*, 2009; Taponen *et al.*, 2009; Koskinen *et al.*, 2010). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la leche contiene bacterias vivas, bacterias muertas y una gran cantidad de DNA bacteriano libre, lo que puede complicar o imposibilitar la interpretación de los resultados. En consecuencia, los cultivos bacterianos son todavía imprescindibles para el diagnóstico etiológico rutinario de las mastitis.

#### II.3.4.4.3. Técnicas -ómicas

En los últimos años, la identificación bacteriana basada en el perfil de proteínas obtenido mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (del inglés, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*) se ha extendido como un método rápido y fiable para este fin, que permite disponer de dicha identificación de manera prácticamente inmediata una vez que se dispone de un crecimiento en placa (Clark *et al.*, 2013; Lau *et al.*, 2014; Nomura, 2015; Patel, 2015; Singhal *et al.*, 2015; Zhou *et al.*,

2015). Además, se puede acoplar a un equipo que realiza el antibiograma de una manera totalmente automatizada, de tal manera que se pueden tener los resultados de la identificación y del antibiograma en un máximo de 48 h (Hrabák *et al.*, 2013; Kostrzewa *et al.*, 2013).

Desde la descripción original de la técnica, se han desarrollado varios sistemas como VITEK MS (bioMérieux) y MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) que son capaces de realizar la identificación bacteriana directamente desde una colonia sin utilizar un procedimiento previo de extracción. Estos sistemas comparan la huella peptídica de la bacteria a identificar con los perfiles que están incorporados en sus bases de datos, llegando a una identificación a nivel de género y especie y, en ocasiones subespecies, con una gran rapidez (90 microorganismos/h aproximadamente). Es importante tener en cuenta que la relación cantidad de microorganismo por  $\mu\text{L}$  de matriz influye de manera muy importante en la obtención de un buen resultado, por tanto es conveniente estandarizar el inóculo. Asimismo, se recomienda que el cultivo no tenga más de 18-24 h de incubación y siempre se debe tratar de cultivos puros.

Los principales inconvenientes estriban en el elevado coste de adquisición y mantenimiento del equipo, las calibraciones y controles de calidad frecuentes que requiere y los relacionados con la limitada estabilidad de la matriz resuspendida (15 días aproximadamente). Asimismo, se han descrito limitaciones respecto la identificación por MALDI-TOF entre los microorganismos pertenecientes al grupo de los estreptococos *viridans* debido a la gran similitud entre las distintas especies y a la necesidad de actualizar las bases de datos para establecer la comparación e identificación de los microorganismos (Dubois *et al.*, 2013; López Roa *et al.*, 2013)

La técnica MALDI-TOF en Medicina Veterinaria se está aplicando cada vez más en el diagnóstico etiológico de la mastitis bovina, especialmente en casos de mastitis subclínica, ya que proporciona un diagnóstico rápido y preciso (Barreiro *et al.*, 2010; Werner *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2014; Tomazi *et al.*, 2014; Schabauer *et al.*, 2014). Asimismo, en la mastitis bovina, los avances en las técnicas proteómicas han llevado a la identificación de diferentes patrones de proteínas en leche con mastitis, información relevante para establecer nuevos biomarcadores que permitirán en un futuro diagnosticar esta enfermedad (Smolenski *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2009; Boehmer, 2011). Igualmente, la reciente aplicación de la proteómica al estudio de la leche humana supone también un valioso instrumento para comprender los cambios del proteoma en respuesta a la mastitis y como estos cambios podrían ser específicos según el tipo de patógeno implicado (Roncada *et al.*, 2013).

Por otra parte, la evaluación del perfil de comunidades bacterianas de la leche mediante técnicas genómicas, ha permitido explorar la diversidad bacteriana en muestras de leche de vacas sanas y con mastitis (Oikonomou *et al.*, 2012; Kuehn *et al.*, 2013) y, recientemente, en leche de mujeres sanas y con mastitis (Jiménez *et al.*, 2015).

#### **II.3.4.4.5. Estudio de la sensibilidad a los antibióticos**

Una vez aislados e identificados los agentes responsables de la mastitis, se deben realizar las pruebas de sensibilidad a los antibióticos de los aislados clínicamente relevantes según los criterios y recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015) o del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST; <http://www.eucast.org>), recogidas en los Procedimientos en Microbiología Clínica 38 y 39 de la SEIMC (2011) sobre “*Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos y gramnegativos*” (Navarro *et al.*, 2011; Morosini *et al.* 2012).

#### **II.3.4.4.6. Criterios para la interpretación e informe de resultados**

La mayor o menor severidad de la sintomatología asociada a una mastitis está estrechamente relacionada con la(s) especie(s) bacteriana(s) implicada(s), su concentración, las características de la cepa y el estado del hospedador.

Cuando se analizan muestras de leche resulta fundamental no considerar la presencia de ECN (especialmente *S. epidermidis*), estreptococos *viridans* (especialmente de los grupos *mitis* y *salivarius*) y corinebacterias como “*flora contaminante*” o “*flora saprófita*”, sino como agentes potencialmente causantes de mastitis. Desafortunadamente, esa apreciación no suele ser habitual y conduce frecuentemente a un diagnóstico no concluyente o erróneo. En este sentido, la presencia de estas especies en leche siempre debe considerarse significativa, tal y como sucede con *S. epidermidis* en muestras de infecciones hospitalarias asociadas dispositivos biomédicos (Namvar *et al.*, 2014) y, en consecuencia, se debe proceder a determinar su antibiograma.

En condiciones fisiológicas, la concentración total de bacterias en muestras recogidas en las condiciones descritas anteriormente suele oscilar entre 100 y 300 UFC/mL, con un límite máximo de, aproximadamente, 600-800 UFC/mL (Jeurink *et al.*, 2013). Cualquier valor por encima de esta concentración puede ser compatible con una mastitis infecciosa. No obstante, el valor suele estar notablemente aumentado en estos casos (> 5.000 UFC/mL). La concentración máxima de bacterias que se puede esperar en una muestra de leche con mastitis se sitúa entre  $1-3 \times 10^6$  UFC/mL.

Por lo que respecta a *S. aureus*, esta especie no suele estar presente en leche humana en condiciones fisiológicas (< 10%) y puede provocar mastitis a concentraciones mucho más bajas que las especies citadas anteriormente (< 500 UFC/mL), por lo que deben valorarse los recuentos bajos cuando existan síntomas de mastitis. Asimismo, la presencia de una concentración baja (< 500 UFC/mL) de corinebacterias en mujeres con mastitis supurativas que aparecen incluso algunos meses después de finalizar la lactancia puede sugerir la presencia de granulomas generados por estas bacterias. También, es posible que existan cultivos mixtos (diversas especies de

los grupos anteriores) en pacientes con mastitis, sin que este hecho indique una contaminación de las muestras.

La presencia de bacterias Gram-negativas (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp., etc.) y levaduras (*Candida* spp.), como se ha señalado anteriormente, suele estar asociada a un protocolo inadecuado de recogida de las muestras. En tales casos, pueden estar presentes en concentraciones muy elevadas ( $> 10^3$  UFC/mL).

Si no se observa crecimiento o este no es significativo tras un tiempo de incubación adecuado, se informará como “*Cultivo negativo*” o “*Crecimiento no significativo*”. Como se ha comentado previamente, en ocasiones este tipo de resultados puede deberse a una concentración bacteriana inferior al límite de detección del método o a la antibioterapia aplicada previamente a la recogida de las muestras. La información sobre este tratamiento previo es esencial, por tanto, a la hora de la recepción de las muestras en el laboratorio.

En cualquier caso, la información emitida por el laboratorio debe ser clara, no dando lugar a falsas interpretaciones, y debe contener los elementos necesarios que ayuden al clínico en la interpretación del resultado. Si se observa un recuento significativo de un solo microorganismo, se informará del mismo con la identificación de la bacteria y la sensibilidad a los antibióticos apropiados. En los cultivos mixtos en los que se valoren todas las morfologías bacterianas presentes en el medio de cultivo, se informará del recuento de cada microorganismo, su identificación y sensibilidad.

#### **II.3.4.5. Diagnóstico diferencial**

Como se ha señalado previamente (apartado II.3.4.3), a toda mujer lactante que presente dolor en el pecho, acompañado o no de otros síntomas, se le debería recoger una muestra de leche lo antes posible para confirmar o descartar una mastitis infecciosa. La instauración rutinaria de este tipo de análisis facilitaría un tratamiento más racional y eficaz. Además, existen otros signos que pueden servir para descartar otros problemas que pueden cursar con dolor en el pecho/pezón.

Por otra parte, cuando una mujer refiere dolor al amamantar, con o sin presencia de grietas, es necesario valorar si la postura del niño al pecho es la correcta o si existe algún tipo de problema anatómico en el niño (anquiloglosia, micrognatia, macrognatia, reflejo hipertónico de lengua, etc.) (Herrero, 2008). Esta valoración se debe hacer lo más rápidamente posible y simultáneamente a la toma de muestras para el análisis microbiológico.

#### **II.3.4.5.1. Síndrome de Raynaud**

Otro problema que es causa de dolor durante el amamantamiento y conviene diferenciarlo de la mastitis lactacional es el síndrome de Raynaud (SR), descrito originalmente como un vasoespasmo de las arteriolas de las partes terminales del cuerpo como los dedos de las manos y los pies, las orejas o la nariz (Raynaud, 1888). Este vasoespasmo, a menudo intensificado por exposición al frío o por situaciones estresantes, causa una isquemia intermitente. Inicialmente, la parte afectada palidece hasta mostrar un aspecto marmóreo; posteriormente, cobra un color azul cianótico debido a la desoxigenación de la sangre venosa; y finalmente, se vuelve rojiza por la vasodilatación refleja. Además de este cambio trifásico (que también puede ser bifásico) en la coloración, se suelen presentar otros síntomas, como un dolor intenso, sensación de quemazón y parestesia (Anderson *et al.*, 2004). En 1992, se sugirió que el vasoespasmo que se produce en el pezón en ciertos casos de amamantamiento doloroso podría estar relacionado con el SR (Coates, 1992); posteriormente, se han descrito diversos casos (Anderson *et al.*, 2004; Page y McKenna, 2006; Morino y Winn, 2007; O'Sullivan y Keith, 2011; Wu *et al.*, 2012; Barret *et al.*, 2013b).

En la mayoría de los casos la lactancia es el primer momento en el que una mujer con SR manifiesta sintomatología, ya que los pechos están frecuentemente expuestos a temperatura ambiente y sujetos a una estimulación mecánica. Sin embargo, el SR es todavía bastante desconocido en los ámbitos ginecológico y pediátrico a pesar de que estos profesionales pueden ser los primeros en valorar a una paciente con este problema (Wu *et al.*, 2012). En consecuencia no es raro que una mujer con SR sea tratada innecesariamente con antibióticos o antifúngicos; de hecho, como el dolor no remite después de este tratamiento, suelen ser sometidas a sucesivos ciclos con diversos agentes antimicrobianos (Morino y Winn, 2007; Wu *et al.*, 2012; Barret *et al.*, 2013b). El análisis microbiológico de la leche ha permitido identificar mujeres con SR a las que se les había diagnosticado una mastitis infecciosa sobre la base del dolor (Delgado *et al.*, 2009c). Un porcentaje alto de mujeres con SR tienen antecedentes de problemas cardiovasculares y, de hecho, la sintomatología asociada a este problema se puede controlar con nifedipina que es un medicamento que también se utiliza para el tratamiento de la hipertensión (Anderson *et al.*, 2004; Barret *et al.*, 2013b).

#### **II.3.4.5.2. Galactoceles**

El término “galactocela” se refiere a un quiste que se forma partir de la obstrucción de un conducto galactóforo y que habitualmente contiene fluido, sea leche o no. Clínicamente, se presenta como un nódulo blando, unilateral, fluctuante, no adherido y circunscrito, con un tamaño promedio de 1 a 5 cm, que no suele ser doloroso a la palpación y presenta un contenido graso o leche viscosa cuando se aspira (Burgos Portillo *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013; Vashi *et al.*, 2013). Suele aparecer algunas semanas o meses después de iniciada la lactancia; sin embargo, una vez suspendida la

lactancia puede persistir y se organiza formando un nódulo caseificado bien delimitado (Burgos Portillo *et al.*, 2012).

A veces este término se emplea inadecuadamente pero no se debería confundir con una retención o ingurgitación mamaria, que no presenta estructura quística, ni con un absceso (que contiene una colección de pus en su interior y que se desarrolla y evoluciona de una forma completamente distinta), ni con un fibroadenoma (tumor fibroepitelial benigno).

#### ***II.3.4.5.3. Fibroadenoma***

El fibroadenoma es el tumor de mama benigno más frecuente en mujeres jóvenes, que se presenta normalmente en forma de una masa firme, móvil y generalmente indoloro. Estos tumores, a menudo múltiples y bilaterales, proliferan en respuesta a estímulos hormonales y, en consecuencia, suelen aumentar de tamaño durante el embarazo y la lactancia como respuesta a los niveles de hormonas circulantes, dando lugar ocasionalmente a dolor regional (Burgos Portillo *et al.*, 2012; Joshi *et al.*, 2013; Vashi *et al.*, 2013).

#### ***II.3.4.5.4. Carcinoma de mama***

Como se ha comentado previamente en el apartado II.3.2.1.3 dedicado a las mastitis granulomatosas, los síntomas y lesiones asociadas a dichas mastitis, habitualmente en forma de nódulo irregular en los cuadrantes superior o central externos, pueden ser muy similares a los del carcinoma de mama (Tuli *et al.*, 2007; Nzegwu *et al.*, 2007; Naraynsingh *et al.*, 2010; Limaïem *et al.*, 2012). Asimismo, las mastitis tuberculosas son una forma poco frecuente de tuberculosis que se presenta como un nódulo en el pecho que puede confundirse clínica y radiológicamente con un carcinoma o un absceso piogénico (Mallick *et al.*, 2014; Prathima *et al.*, 2014). El diagnóstico diferencial entre la mastitis y las patologías mencionadas se debe establecer mediante un análisis citológico, histológico y/o microbiológico.

#### ***II.3.4.5.5. Lesiones de los pezones y la areola mamaria***

Es muy importante destacar que, con cierta frecuencia, se diagnostican problemas que afectan a la areola mamaria o al pezón como eczemas, dermatitis atópicas u otras denominaciones, cuando realmente se trata de infecciones estafilocócicas o estreptocócicas. En algunos de estos casos se prescriben corticoides tópicos, lo que conduce a un estado transitorio de inmunodepresión en la zona, que favorece el mantenimiento o la propagación de la infección. Si la lesión de la piel está ocasionada por una cepa de *S. aureus* productora de toxina exfoliativa, la aplicación indebida de corticoides puede desembocar en un síndrome de piel escaldada, enfermedad que cursa como un exantema cutáneo doloroso que culmina con el desprendimiento de la dermis

superficial (Patel y Finlay, 2003; Bukowski *et al.*, 2010). Para evitar ese error, el diagnóstico puede establecer poniendo una placa de cultivo con medio agar sangre directamente sobre la areola mamaria y el pezón durante unos segundos. Tras 24 h de incubación a 37 °C, sabremos si *S. aureus* está presente o no en las lesiones.

Algún caso de mastitis con afectación del pezón podría confundirse con herpes. El virus del herpes simple se ha aislado en la leche materna, pero su transmisión por esta vía es muy rara. Únicamente se suele desaconsejar la lactancia si la madre presenta lesiones herpéticas activas en los pezones o cerca de ellos (Díaz-Gómez, 2005; Barret *et al.*, 2013a).

### **II.3.5. TRATAMIENTO DE LAS MASTITIS: RELACIÓN CON LA SINTOMATOLOGÍA Y LOS AGENTES ETIOLÓGICOS**

El tratamiento de las mastitis infecciosas debería instaurarse tras un análisis microbiológico que determine el agente causal y su sensibilidad a los antibióticos (Arroyo *et al.*, 2011; Carrera *et al.*, 2012; Fernández y Rodríguez, 2014). Desafortunadamente no suele ser lo habitual, aunque los servicios de Microbiología de algunos hospitales españoles ya han empezado a realizar cultivos de leche teniendo en cuenta las instrucciones de recogida de las muestras y de interpretación de los resultados que se han descrito en el capítulo anterior (apartado II.3.4.4).

El objetivo de este apartado es presentar, de forma sencilla y concisa, una propuesta de actuación para el tratamiento de las mastitis infecciosas (Tabla 11), fundamentalmente dirigida a aquellos casos en los que no sea posible la realización de cultivos y antibiogramas o en los que no se pueda esperar a los resultados para iniciar el tratamiento.

#### **II.3.5.1. Tratamiento de las mastitis agudas**

Las mastitis agudas son cuadros caracterizados por una intensa inflamación local, con ingurgitación y síntomas sistémicos. Ante un cuadro de este tipo, agudo y sistémico, es razonable iniciar un tratamiento antibiótico. Actualmente, lo más habitual es que se prescriba un antibiótico  $\beta$ -lactámico (cloxacilina o amoxicilina con/sin ácido clavulánico). En general, la opción más recomendable, en ausencia de cultivo, sería la combinación amoxicilina + ácido clavulánico (1.000/62,5 mg) en comprimidos de liberación prolongada (Tabla 11). La cloxacilina ha sido durante muchos años el antibiótico de elección para estos casos pero, actualmente, su eficacia es bastante limitada frente a las cepas de *S. aureus* causantes de mastitis. Conviene también tener en cuenta que un elevado número de cepas (> 50%) son resistentes a la metilicina (Moazzez *et al.*, 2007; Berens *et al.*, 2010; Branch-Elliman *et al.*, 2012).

**Tabla 11.** Propuesta de tratamiento para los distintos tipos de mastitis

<b>AGUDAS</b>	<b>ANTIBIÓTICO</b>	Amoxicilina/ácido clavulánico (1000/62,5 mg cada 8-12 h; 7-10 d) Evitar cloxacilina (elevado porcentaje de cepas resistentes) Cefalosporinas
	<b>PROBIÓTICO</b>	<i>L. salivarius</i> , <i>L. fermentum</i> , otras especies específicamente seleccionadas (1x10 <sup>9</sup> UFC 3 veces al día; 14-21 d) Alternativa a los antibióticos en mastitis agudas moderadas Complemento a antibióticos en mastitis agudas severas
	<b>ANTIINFLAMATORIO</b>	Siempre en combinación con antibiótico y/o probiótico Si hay fiebre: alternar paracetamol e ibuprofeno (600 mg-1 g 2-4 veces/d; 7 d) Si no hay fiebre: ibuprofeno (600 mg-1 g de 2-4 veces/d; 7 d)
	<b>QUIRÚRGICO</b>	Exclusivamente en el caso de formación de abscesos
<b>SUBAGUDAS</b>	<b>ANTIBIÓTICO</b>	Sólo en caso de ser ineficaz el tratamiento con probióticos Ciprofloxacino (750 mg cada 12 h, 7-10 d) o cotrimoxazol
	<b>PROBIÓTICO</b>	Igual que para las mastitis agudas Tratamiento de elección en estos casos (junto a antiinflamatorio)
	<b>ANTIINFLAMATORIO</b>	Siempre en combinación con antibiótico y/o probiótico Ibuprofeno (600 mg-1 g de 2-4 veces/d; 7 d)
	<b>ANTIBIÓTICO</b>	Elegir el antibiótico más liposoluble entre los que muestren eficacia en el antibiograma
<b>GRANULOMATOSAS</b>	<b>PROBIÓTICO</b>	Alternativa atractiva, pero efecto desconocido
	<b>ANTIINFLAMATORIO</b>	Siempre en combinación con antibiótico y/o probiótico Si no hay fiebre: ibuprofeno (600 mg-1 g de 2-4 veces/d; 7 d)
	<b>QUIRÚRGICO</b>	Eliminación de las masas, fístulas y abscesos En ciertos casos, reconstrucción de mama
	<b>PROBIÓTICO</b>	Igual que para las mastitis agudas/subagudas Tratamiento de elección en estos casos (sólo o junto a antiinflamatorio)
<b>SUBCLÍNICAS</b>	<b>ANTIINFLAMATORIO</b>	En combinación con probiótico Ibuprofeno (600 mg-1 g de 1-2 veces/d; 7 d)

Siempre es conveniente realizar un cultivo y antibiograma, por si la(s) cepa(s) causante(s) de la mastitis fuese(n) resistente(s) a los antibióticos propuestos.

Fuente: Carrera *et al.* (2012)



Muchas veces, el clínico opta por concentraciones bajas del principio activo al tratarse de una mujer lactante; sin embargo, en general suele ser mejor una concentración elevada que actúe rápidamente y que minimice la generación de resistentes. Es importante destacar que la concentración de residuos de antibióticos en leche no es directamente proporcional a la concentración administrada. En este sentido, la información proporcionada por las bases de datos más fiables sobre medicamentos y lactancia (LactMed, United States National Library of Medicine; <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?LACT>; e-lactancia; Servicio de Pediatría del Hospital de Denia; <http://www.e-lactancia.org>) puede resultar muy útil para el facultativo (Tabla 12).

El tratamiento de estos casos con  $\beta$ -lactámicos (u otros antibióticos) puede conducir a tres situaciones: (1) que el tratamiento sea eficaz y que el problema se solucione completamente aunque, desafortunadamente, no es la situación más frecuente; (2) que la(s) cepa(s) de *S. aureus* implicada(s) sea(n) resistente(s), de tal manera que el cuadro no sólo no mejora sino que se mantiene e, incluso, puede empeorar al crearse un ambiente propicio para el crecimiento selectivo de dichas cepas (aspecto que se tratará en el apartado II.3.5.5); y (3) que sea eficaz frente a *S. aureus* pero que seleccione el crecimiento de ECN o de estreptococos. Este último caso suele ser bastante común, de tal manera que la mastitis aguda se transforma en subaguda y, a partir de ese momento, habría que tratarla como tal (apartado II.3.5.2).

### **II.3.5.2. Tratamiento de las mastitis subagudas y subclínicas**

En general, los agentes causantes de mastitis subagudas y subclínicas son más resistentes a la antibioterapia pero, afortunadamente, responden bastante bien al tratamiento con probióticos (Fernández *et al.*, 2014; Beltrán Vaquero *et al.*, 2015). Los probióticos son microorganismos vivos que ejercen efectos beneficiosos sobre un hospedador y tienen diversas aplicaciones para el binomio madre-hijo (Rodríguez y Dalmau, 2007a; Rodríguez y Dalmau, 2007b). En los últimos años, dos ensayos clínicos han demostrado que ciertos lactobacilos aislados de leche humana representan una alternativa más eficaz que los antibióticos para el tratamiento de las mastitis subagudas (Jiménez *et al.*, 2008c; Arroyo *et al.*, 2010), careciendo de los efectos secundarios de aquellos (candidiasis, gastroenteritis, etc.). En tales casos, la combinación de un probiótico y un antiinflamatorio no esteroideo constituye la forma más suave y, a la vez, más eficaz de abordar este tipo de problemas (Jiménez *et al.*, 2008c; Arroyo *et al.*, 2010).

En general, algunas cepas de la especie *L. salivarius* aisladas de leche humana (*L. salivarius* CECT5713) parecen ser una buena opción para el tratamiento de las mastitis agudas y las mejores candidatas para el tratamiento de las mastitis subagudas (Jiménez *et al.*, 2008c; Arroyo *et al.*, 2010), ya que son eficaces en más de un 90% de los casos (Tabla 11). En este sentido, conviene recordar que las propiedades probióticas

**Tabla 12.** Nivel de riesgo y parámetros cinéticos de diversos medicamentos empleados en el tratamiento de las mastitis

<b>Medicamento</b>	<b>Nivel de riesgo<sup>1</sup></b>	<b>Peso molecular (daltons)</b>	<b>T<sub>máx</sub><sup>2</sup> (h)</b>	<b>Unión proteínas<sup>3</sup></b>	<b>T<sub>1/2</sub><sup>4</sup> (h)</b>	<b>Índice leche/plasma<sup>5</sup></b>	<b>Biodisponibilidad oral<sup>6</sup> (%)</b>	<b>Dosis terapéutica (mg/kg/día)</b>	<b>Dosis relativa<sup>7</sup> (%)</b>
<i>Amoxicilina</i>	0	365	1,5	18	1,7	0,04	89	0,1	0,4
<i>Amoxicilina+ácido clavulánico</i>	0	365	1,5	18	1,7	0,04	89	0,1	0,4
<i>Cloxacilina</i>	0	436	2	90	3	-	60	0,06	0,36
<i>Ciprofloxacino</i>	0	331	2,3	40	4	2	85	0,6	7,2
<i>Cotrimoxazol</i>	1	-	4	-	10	-	100	-	-
<i>Paracetamol</i>	0	151	2	10	3	1,9	85	0,9	1-4
<i>Ibuprofeno</i>	0	206	3	90	2,5	0,01	80	0,075	0,2

Fuente: e-lactancia (Servicio de Pediatría, Hospital de Denia; <http://www.e-lactancia.org>); Fernández y Rodríguez (2014)

<sup>1</sup>Nivel de riesgo: (a) Nivel 0: sustancia con seguridad demostrada para el lactante. Producto seguro, compatible con la lactancia; (b) Nivel 1: sustancia que podría provocar efectos adversos muy leves sobre el lactante o de la que no hay datos publicados pero sus características físico-químicas y farmacocinéticas de absorción, distribución y eliminación del producto hacen muy poco probable la aparición de efectos adversos. Producto moderadamente seguro

<sup>2</sup>Tiempo máximo: Tiempo necesario (h) para alcanzar la concentración máxima desde la administración. Es justo el momento en el que hay que evitar dar el pecho

<sup>3</sup>Unión proteínas: Porcentaje de fijación de la sustancia a las proteínas plasmáticas (baja:<50%, media: 50-80%; alta:>80%)

<sup>4</sup>T<sub>1/2</sub>: Semivida de eliminación. Es el tiempo que tarda la concentración plasmática de una sustancia en reducirse a la mitad

<sup>5</sup>Índice leche/plasma: Relación de concentración de una sustancia en la leche respecto a su concentración en el plasma

<sup>6</sup>Biodisponibilidad oral: Porcentaje de sustancia que alcanza la circulación sistémica tras la administración oral

<sup>7</sup>Dosis relativa del lactante: Porcentaje de la dosis materna de un medicamento que llega al lactante. Se consideran seguras cifras inferiores al 10%

más adecuadas para una diana concreta (las mastitis en este caso) dependen de cada cepa; es decir, cuando se adscribe un efecto probiótico a una cepa, no se puede extrapolar esa propiedad a las restantes cepas de la misma especie. Asimismo, la adscripción de un efecto probiótico a una cepa depende de las condiciones de empleo y, muy particularmente, de la posología (Rodríguez, 2015). En el caso de la cepa de *L. salivarius* citada anteriormente, la dosis recomendable con fines terapéuticos sería de  $1 \times 10^9$  UFC tres veces al día durante 2-3 semanas, mientras que se podría tomar una dosis diaria de  $1 \times 10^9$  UFC durante toda la lactancia con fines preventivos. Conviene señalar que la eficacia de estas cepas deriva de una selección rigurosa basada en criterios relacionados con las mastitis. En la actualidad la cepa *L. salivarius* CECT5713, así como otra cepa de la especie *L. fermentum* aislada de leche humana (*L. fermentum* CECT5716) con eficacia en  $\sim 50$ -60% de los casos (Arroyo *et al.*, 2010), están comercializadas para el tratamiento de las mastitis. Alternativamente, se puede recurrir a otros productos disponibles en la farmacia, que contienen cepas de otras especies de lactobacilos (*L. reuteri*, *L. acidophilus*, etc.). La eficacia de estas cepas suele ser notablemente inferior ( $< 30\%$  de los casos) debido a que están seleccionadas para otro tipo de problemas (por ejemplo, gastroenteritis infecciosas), que requieren cepas con otras propiedades.

En los casos en los que el tratamiento probiótico (primera opción) no curse adecuadamente, se puede optar por un antibiótico (segunda opción). Sin embargo, los  $\beta$ -lactámicos no suelen ser muy eficaces frente a los agentes etiológicos de este tipo de mastitis. Por lo tanto, hay que contemplar el posible uso de otros antibióticos que tradicionalmente no se han tenido en cuenta durante la lactancia, como el ciprofloxacino (Tablas 11 y 12). La capacidad de este antibiótico para penetrar y difundirse en las biopelículas o *biofilms* formadas por *S. epidermidis* es mayor que la de los  $\beta$ -lactámicos (Singh *et al.*, 2010). Hace años hubo cierta controversia sobre el uso de las quinolonas en pediatría y durante la lactancia debido a posibles efectos adversos sobre el cartílago articular de los niños; sin embargo, se demostró que el ciprofloxacino, no sólo carece de dicho efecto para la especie humana, sino que se trata de uno de los antibióticos más seguros en neonatología (Gürpınar *et al.*, 1997; Dutta *et al.*, 2006; Adefurin *et al.*, 2011). En este sentido, actualmente se considera un medicamento de riesgo 0 en lactancia y, por lo tanto, compatible con la misma ([www.e-lactancia.org/](http://www.e-lactancia.org/)). Así, el tratamiento de una mujer lactante por vía oral con una dosis de 750 mg cada 12 h significaría que un niño alimentado con lactancia materna exclusiva recibiría una concentración máxima de 0,57 mg/kg al día, una dosis muy inferior a la habitual (10-40 mg/kg al día) cuando se tratan directamente los neonatos con el mismo antibiótico (Gürpınar *et al.*, 1997; van den Oever *et al.*, 1998; Belet *et al.*, 2004; Drossou-Agakidou *et al.*, 2004; Adefurin *et al.*, 2011). Adicionalmente, la pequeña cantidad que llega al niño apenas se absorbe debido a la interferencia causada por el calcio de la propia leche (Belet *et al.*, 2004). Obviamente, el hecho de que se trate de un medicamento seguro en lactancia no evita que existan cepas de estafilococos y estreptococos resistentes a

fluoroquinolonas y, de hecho, la tasa de resistencias a este grupo de antibióticos también ha aumentado en los últimos años (Dalhoff, 2012). Finalmente, hay que advertir que los suplementos de hierro (frecuentes durante la lactancia) disminuyen la biodisponibilidad de ciprofloxacino, reduciendo su eficacia.

El cotrimoxazol, sólo o en combinación, podría ser otra opción ya que suele ser bastante activo frente a estafilococos (Tablas 11 y 12). En contraste, otros antibióticos como la eritromicina (y otros macrólidos) o la fosfomicina suelen ser poco efectivos frente a los agentes implicados en la mastitis, incluso cuando el resultado del antibiograma indica que son teóricamente sensibles a ellos. En este sentido, siempre hay que valorar la capacidad de penetración de *biofilms* a la hora de seleccionar el mejor antibiótico para un caso de mastitis (Singh *et al.*, 2010).

### II.3.5.3. Tratamiento de las mastitis granulomatosas

Hasta recientemente, el manejo de las mastitis granulomatosas era muy complicado al desconocerse su etiología. En consecuencia, a menudo implicaba soluciones quirúrgicas, con la resección del tejido afectado (incluyendo la mastectomía parcial o total) y/o el empleo de corticosteroides por vía oral (Azlina *et al.*, 2003; Asoglu *et al.*, 2005; Kok y Telisinghe, 2010; Hladik *et al.*, 2011; Gurleyik *et al.*, 2012). El tratamiento con corticoides, no obstante, es controvertido debido a las complicaciones como abscesos, fistulas e infecciones persistentes de las heridas (Kok y Telisinghe, 2010; Eroztgen *et al.*, 2010).

El descubrimiento de la etiología infecciosa de las mastitis granulomatosas relacionada con corinebacterias (Paviour *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2003; Mathelin *et al.*, 2005) abrió nuevas perspectivas para su diagnóstico y su tratamiento, incluyendo el empleo de antibióticos. No obstante, de forma similar a lo descrito para mastitis agudas y subagudas, se observó que el empleo de antibióticos como la penicilina, amoxicilina y afines no proporcionaba grandes beneficios, ni siquiera cuando se administraban durante tiempos prolongados y/o por vía intravenosa, a pesar de que las corinebacterias aisladas eran sensibles *in vitro* al antibiótico prescrito. Esto se debe a la estructura de los granulomas, en los que la bacteria causal se encuentra en contacto estrecho con material lipídico (Dobinson *et al.*, 2015). En este sentido, resulta ilustrativo el caso de una paciente que fue tratada durante tres semanas con penicilina por vía intravenosa sin ningún resultado pero que mejoró notablemente tras la administración de doxiciclina por vía oral (Paviour *et al.*, 2002). El éxito de este último antibiótico parece estar íntimamente ligado a su mayor solubilidad en lípidos, por lo que es importante considerar este aspecto durante el tratamiento de este tipo de mastitis (Tabla 11). Asimismo, hay que tener en cuenta que, en muchas ocasiones, los síntomas de mastitis granulomatosa aparecen cuando la mujer ya no está lactando, de tal manera que el espectro de medicamentos que se puede emplear en estos casos es más amplio. La

posible utilidad de probióticos en la resolución de este tipo de mastitis está todavía por determinar

#### II.3.5.4. Tratamiento de los abscesos

El tratamiento de los abscesos requiere siempre un abordaje quirúrgico con el empleo de anestesia. En muchos casos se puede drenar el material purulento mediante punción guiada por ecografía, mientras que en otros se secciona la zona afectada, drenando su contenido y eliminando el material capsular (Ulitzsch *et al.*, 2004; Cusack y Brennan, 2011; Kataria *et al.*, 2013). En general, se suele prescribir un tratamiento antibiótico que, en ausencia de cultivo, debería ser similar a los de elección para mastitis agudas, ya que *S. aureus* predomina en la mayoría de los casos de abscesos (Moazzez *et al.*, 2007; Stafford *et al.*, 2008; Branch-Elliman *et al.*, 2012). El tratamiento quirúrgico de los abscesos es totalmente compatible con el mantenimiento de la lactancia.

#### II.3.5.5. El fracaso de los antibióticos en el tratamiento de las mastitis

Inicialmente, la penicilina constituyó el tratamiento de elección contra infecciones por estafilococos pero las resistencias se generalizaron rápidamente y el testigo pasó a las penicilinas resistentes a penicilasas de bajo (oxacilina, nafcilina, meticilina, dicloxacilina, cloxacilina), medio (amoxicilina) o, más recientemente, amplio (amoxicilina + ácido clavulánico) espectro. Actualmente, el porcentaje de mastitis que se curan con antibioterapia es relativamente bajo, una situación que también se observa en medicina veterinaria (Rich *et al.*, 2005; Lüthje y Schwarz, 2006; Oliver y Murinda, 2012). Este hecho se debe a tres razones fundamentales: (1) el aumento de cepas resistentes a los antibióticos; (2) la formación de *biofilms*; y (3) la coexistencia de cepas con distinta sensibilidad a los antibióticos.

Por lo que respecta al primer punto, resulta llamativo que la resistencia a la meticilina y afines, antibióticos que frecuentemente constituyen la primera elección en infecciones estafilocócicas, sea del 75-90% entre los aislados hospitalarios de *S. epidermidis* y del 40-60% entre los de *S. aureus* (Diekema *et al.*, 2001). En algunos países, como Holanda, la implantación de unos programas muy estrictos de higiene ha conseguido reducir notablemente la prevalencia de las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina en los hospitales (Vos *et al.*, 2005); sin embargo, estas medidas han sido mucho menos exitosas frente a las cepas de *S. epidermidis* resistentes al citado antibiótico (van Pelt *et al.*, 2003).

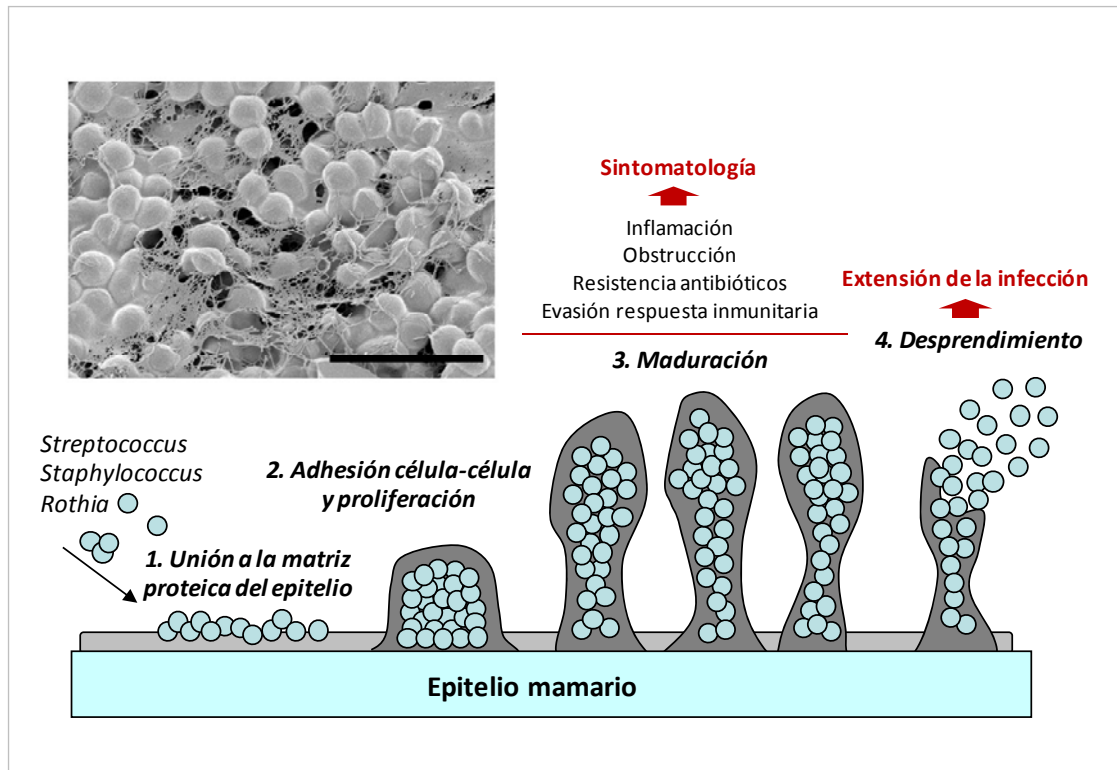
La alta resistencia a la meticilina se encuentra codificada en elementos genéticos móviles y, más concretamente, en el cassette cromosómico estafilocócico SCCmec (*del inglés, Staphylococcal Cassette Chromosome*). El SCCmec contiene el gen *mecA*, que codifica una proteína de unión a la penicilina (PBP2a), con una afinidad por la

meticilina bastante menor que la de otras proteínas de unión a la penicilina (Hiramatsu *et al.*, 2001). Hasta el momento, se han identificado 11 elementos SCCmec diferentes en *S. epidermidis*, siendo el más abundante el SCCmec de tipo IV (36%) (Ma *et al.*, 2002; Miragaia *et al.*, 2005; *International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements*, 2009). La presencia de este tipo es relevante ya que, a diferencia de los otros, no significa un coste metabólico para la célula bacteriana que lo porta y, en consecuencia, se puede extender en ausencia de la presión selectiva impuesta por la exposición al antibiótico (van Pelt *et al.*, 2003). Por otra parte, existen evidencias que demuestran que tanto los SCCmec como otros elementos genéticos móviles actualmente extendidos en *S. aureus* fueron originalmente adquiridos a partir de cepas de *S. epidermidis* (Vos *et al.*, 2005).

En cualquier caso, los genes que confieren resistencia específica frente a antibióticos están ampliamente extendidos en *S. epidermidis* (Otto, 2012; 2014), que constituye un auténtico reservorio para otros estafilococos. Además de la resistencia a la meticilina, las cepas de *S. epidermidis* han adquirido resistencia a muchos otros antibióticos, incluyendo gentamicina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, flouroquinolonas y sulfonamidas (Rogers *et al.*, 2009). A pesar de ello, el 80% de las infecciones asociadas a catéteres pueden ser tratadas con otros antibióticos, como la vancomicina, sin necesidad de la retirada del catéter (Raad *et al.*, 2007). Éste podría ser el caso de las mastitis ya que la glándula mamaria durante la lactancia realmente se podría equiparar a un complejo “sistema de catéteres”; sin embargo, la vancomicina es uno de los últimos antibióticos eficaces frente a estafilococos multirresistentes y, además, su uso es exclusivamente hospitalario.

Tampoco se puede asegurar la eficacia de la antibioterapia cuando los resultados de un antibiograma reflejan la sensibilidad, en teoría, de un agente causal de mastitis frente a ciertos antibióticos. Esto se debe a que las pruebas de resistencia a antibióticos se realizan en condiciones que poco tienen que ver con las que se encuentran en una mastitis, infección que se suele caracterizar por la formación de densas biopelículas o *biofilms* en los conductos galactóforos. Los *biofilms* son aglomeraciones de microorganismos firmemente adheridos a una superficie, con una fisiología y una arquitectura muy características que forman la base de la gran resistencia que presentan a muchos antibióticos y a los mecanismos de defensa del hospedador (Høiby *et al.*, 2010; Høiby *et al.*, 2011; Kostakioti *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013; Speziale y Geoghegan, 2015). El proceso de formación de un *biofilm* empieza con la adhesión inicial de las células bacterianas a una superficie y su subsiguiente agregación en estructuras multicelulares (Figura 19). En consecuencia, su desarrollo requiere fuerzas adhesivas tanto para la colonización de la superficie como para el establecimiento de interacciones célula-célula. Paralelamente, se necesitan fuerzas disruptivas para la formación de los canales que suministrarán los nutrientes a todas las células del *biofilm*; ambas fuerzas son responsables de la típica estructura tridimensional de un *biofilm* maduro. Las fuerzas disruptivas también están implicadas en el desprendimiento de

ciertos grupos de células del *biofilm*, lo que limita la expansión del *biofilm* pero conduce a la diseminación de la infección (O'Toole *et al.*, 2000; Donlan y Costerton, 2002; Monds y O'Toole, 2009; Otto, 2013).



**Figura 19.** Representación esquemática del proceso de formación de un *biofilm* en el interior de los conductos galactóforos durante una mastitis. Fuente: Adaptada de Carrera *et al.* (2012). Fotografía: *Rothia mucilaginosa*, bacteria implicada en mastitis subagudas, formando un *biofilm*. Fuente: Yamane *et al.* (2010)

Los genomas de los estafilococos, en general, y de *S. epidermidis*, en particular, muestran una especial adaptación al modo de crecimiento en forma de *biofilms*, incluyendo la regulación negativa de procesos celulares básicos, como la biosíntesis de ácidos nucleicos, de proteínas y de la pared celular (Yao *et al.*, 2005). Estos cambios en la regulación génica explican por qué la actividad de muchos antibióticos cuya diana son las células bacterianas que crecen activamente (por ejemplo, penicilinas o aminoglucósidos) es muy limitada frente a los *biofilms* de *S. epidermidis* (Büttner *et al.*, 2015). Además, la capacidad de penetración en un *biofilm* varía dependiendo del antibiótico; así, recientemente se ha observado que la capacidad de la oxacilina, la cefotaxima y la vancomicina para penetrar en *biofilms* de *S. aureus* o *S. epidermidis* es

muy reducida, en contraste con la de la amikacina o el ciprofloxacino (Singh *et al.*, 2010).

### II.3.5.6. Antiinflamatorios no esteroideos

Cuando la respuesta inmunitaria frente a un microorganismo es demasiado intensa, la propia reacción del hospedador se convierte en co-responsable de la patología y la sintomatología. En tales casos, el problema suele radicar en una inflamación perjudicial para el órgano afectado, independientemente de que el microorganismo haya podido ser controlado o no (Casadevall y Pirofski, 2003). Entre los ejemplos de este fenómeno se incluyen enfermedades estafilocócicas, como el síndrome de *shock* tóxico, cuya patogenia se basa en la excesiva activación de la respuesta inmunitaria frente a una toxina estafilocócica (Larkin *et al.*, 2009; Lin y Peterson, 2010). La situación es similar en las mastitis agudas causadas por *S. aureus* y también, en menor medida, en las subagudas. En estas infecciones, la terapia antimicrobiana, por sí sola, fracasa frecuentemente porque no reduce la respuesta inflamatoria. De hecho, las nuevas direcciones en el tratamiento de enfermedades infecciosas que se caracterizan por una intensa inflamación implican el empleo de terapias antiinflamatorias complementarias a las antiinfecciosas (Pirofski y Casadevall, 2012).

En consecuencia, la resolución de las mastitis de cualquier tipo en un tiempo prudencial requiere que el tratamiento antibiótico se asocie con un antiinflamatorio no esteroideo. En las mastitis agudas con fiebre elevada es recomendable alternar paracetamol (650 mg o 1 g) e ibuprofeno (600 mg). Ambos son de riesgo 0 en lactancia y se pueden administrar cada 4-6 h (Tablas 11 y 12). Si no existe fiebre, o ya ha desaparecido, habría que optar únicamente por el ibuprofeno, ya que presenta un potencial antiinflamatorio superior al paracetamol. En cualquier caso, es necesario evitar el empleo de corticoides ya que, aunque pueden aliviar momentáneamente la sintomatología, también pueden favorecer una progresión de la infección.

### II.3.5.7. Prácticas no recomendables durante la mastitis

El dolor en los pezones durante la lactancia es un problema común tanto para las madres lactantes que lo sufren, como para aquellos que deben proporcionar el tratamiento. Sin embargo, varias revisiones sistemáticas sobre posibles intervenciones para aliviar dicho dolor aplicando compuestos como lanolina o gotas de la propia leche, entre otros, han llegado a resultados no concluyentes (Vieira *et al.*, 2013; Dennis *et al.*, 2014). A pesar de la falta de evidencias científicas, extenderse unas gotas de la propia leche y/o aplicar lanolina en el pezón y areola mamaria después de las tomas es una práctica muy habitual, que no representa un problema si no hay síntomas de mastitis. No obstante, ante la presencia de mastitis, esta práctica favorece la propagación de las bacterias causantes del problema en el caso de aplicarse leche en el pezón y, en el caso



de la lanolina, se crea un ambiente húmedo propicio para el crecimiento de los microorganismos causantes de la mastitis. En tales casos, sería mejor aplicar una capa de aceite de oliva, que no favorece el crecimiento bacteriano y cuyo componente principal (el ácido oleico) tiene propiedades antiinflamatorias (Oğuz *et al.*, 2014).

Otra práctica frecuente durante la mastitis, que debe evitarse, es la aplicación de calor local (Fernández y Rodríguez, 2014). Cuando las bacterias crecen por encima de los límites fisiológicos, los *biofilms* conducen a la inflamación y obstrucción de los conductos galactóforos, provocando una retención de leche. A medida que aumenta la retención, la secreción de leche se encuentra obstaculizada y las tomas pueden llegar a ser muy largas y dificultosas para la madre. En tales circunstancias, la aplicación de calor puede aliviar momentáneamente el cuadro ya que dilata los conductos y, por lo tanto, la leche sale con menos dificultad. Sin embargo, al mismo tiempo la temperatura del pecho aumenta, creándose condiciones óptimas para la multiplicación de las bacterias que están causando la mastitis y favoreciendo la persistencia de la inflamación. En conclusión, el calor proporciona un alivio pasajero pero el cuadro se prolonga en el tiempo. Si bien lo deseable sería prescindir de la aplicación de calor, en aquellos casos en los que las mujeres tengan una retención tan importante que únicamente sienten alivio aplicándose calor, éste se debería aplicar inmediatamente (3-5 minutos) antes de la toma y debería ir seguido, inmediatamente después de la misma, de la aplicación de frío local (5-10 minutos) para reducir el dolor y el edema (Amir y *Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee*, 2014).

## **II.4. FACTORES DE RIESGO Y FACTORES PROTECTORES DE LA MASTITIS INFECCIOSA**

Como se ha descrito en el Capítulo II.3, la tasa de mujeres que sufren mastitis durante la lactancia es elevada y puede alcanzar cifras de hasta un 33% si se tienen en consideración todos los tipos de mastitis (Foxman *et al.*, 2002; Betzold, 2007; Scott *et al.*, 2008; Spencer, 2008; Fernández y Rodríguez, 2014). No obstante, la mayoría de las mujeres no la padecen. El hecho de que una mujer sufra mastitis o disfrute de una lactancia placentera está relacionado con una serie de factores, algunos de ellos difíciles de controlar, que predisponen a la presentación de estos cuadros o que, por el contrario, actúan como protectores. Diversos estudios epidemiológicos han investigado la incidencia de los potenciales factores de riesgo que podrían estar implicados en el desarrollo de esta enfermedad (Vogel *et al.*, 1999; Kinlay *et al.*, 2001; Foxman *et al.*, 2002; Amir *et al.*, 2006; Amir *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2008), si bien la mayoría fueron llevados a cabo hace más de una década. Asimismo, el conocimiento sobre los factores de protección frente a la mastitis y los mecanismos implicados en su desarrollo es todavía un campo de investigación incipiente en medicina humana.

En este apartado se presentan los factores que conocemos en la actualidad, aunque es muy posible que el listado de ambos tipos de factores aumente notablemente en los próximos años como resultado de las investigaciones en curso.

### **II.4.1. FACTORES DE RIESGO**

La predisposición al desarrollo de una mastitis infecciosa puede estar relacionada con el sistema inmunitario del hospedador y las bacterias implicadas en la mastitis, así como con otros factores relacionados con la historia médica de la madre, el embarazo, el parto y la lactancia (Fernández y Rodríguez, 2014).

#### **II.4.1.1. Factores del sistema inmunitario del hospedador**

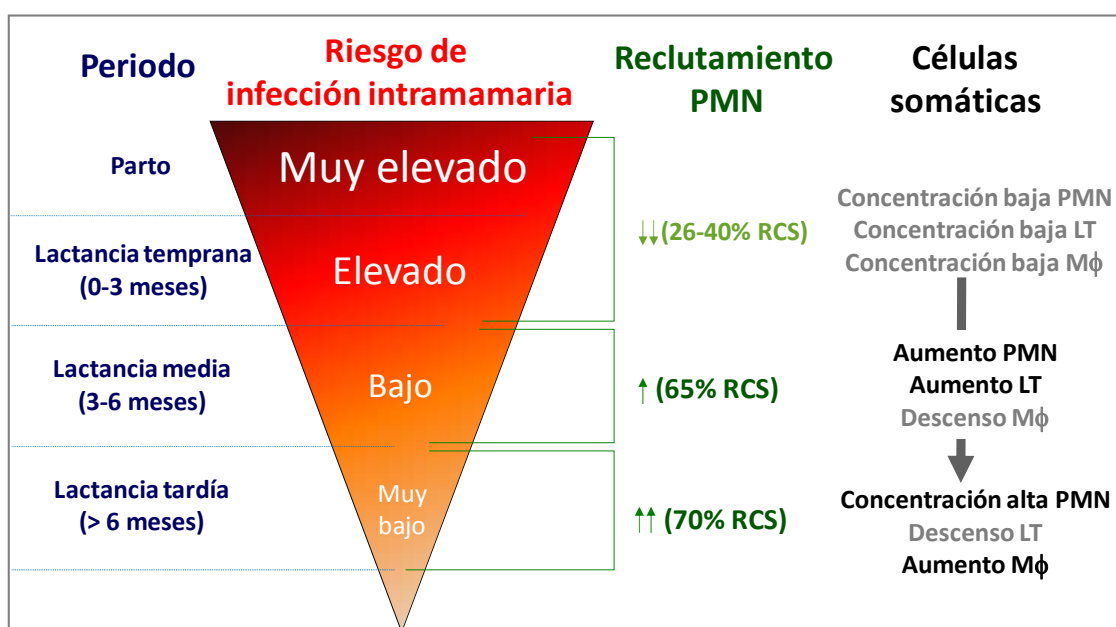
Existen diversos factores relacionados con el sistema inmune del hospedador que pueden favorecer los procesos de disbiosis en las mucosas humanas y, eventualmente, conducir a infecciones, si bien, hasta la fecha, han sido muy poco estudiados en el ámbito de la glándula mamaria. Algunos de ellos podrían intervenir en la alteración de los mecanismos de la inmunidad innata, entre los que destacan: (a) la disminución de la activación de los receptores de tipo Toll (TLR; del inglés *Toll-Like Receptors*) en las células presentadoras de antígenos; (b) las alteraciones en la producción extracelular de proteínas que intervienen en las reacciones de estrés celular; (c) una inadecuada liberación o función de las lectinas de unión de manosas; (d) concentraciones elevadas de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\alpha$ / $\beta$ , IL-6, IL-8) o bajas de citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13) en las secreciones mamarias.

Existen muchos genes implicados en la regulación del sistema inmunitario y cualquier polimorfismo (ya sea un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP, un microsatélite o una variante estructural) que altere el reconocimiento o el control de ciertos microorganismos puede contribuir a un crecimiento excesivo de los mismos. Los polimorfismos en el complejo génico de la interleuquina 1 (IL-1) asociados a las alteraciones de la microbiota vaginal constituyen un buen ejemplo (Rodríguez, 2012). Así, la presencia de un microsatélite en el intrón 2 del gen *IL1RN* determina la existencia de 5 alelos distintos. Pues bien, en las mujeres portadoras homocigotas de alelo 1 (*IL1RN\*1*) se observa una mayor concentración de IL-1 $\beta$ , de bacilos anaerobios Gram-negativos y de *Gardnerella vaginalis* en sus secreciones vaginales y a una mayor tasa de embarazos con un parto prematuro.

Por lo que respecta a la glándula mamaria y a la predisposición a padecer mastitis, recientemente se ha descrito la primera asociación entre la mastitis granulomatosa causada por *Corynebacterium kroppenstedtii* y un SNP en el gen *NOD2* (SNP13 [Leu1007fsinsC]) que altera radicalmente la funcionalidad de los neutrófilos (Bercot *et al.*, 2009) y explica, al menos parcialmente, la presencia de la enfermedad. En los próximos años es muy posible que se describan otros polimorfismos relacionados con las mastitis causadas por distintas especies de bacterias.

Aparte de los factores citados anteriormente, conviene tener en cuenta que, para el sistema inmunitario, el control de las infecciones intramamarias resulta bastante más complicado que el de otro tipo de infecciones, ya que, por una parte, la leche tiene un efecto diluyente sobre los factores inmunitarios reclutados por el tejido mamario y, por otra, la grasa y las caseínas de este fluido biológico ejercen un efecto bloqueante sobre estos mismos factores. Para evitar estos inconvenientes, el suministro de efectores inmunológicos a la glándula mamaria debe ser continuo y en una cantidad mucho más elevada que la necesaria para la protección de otros tejidos u órganos. Algunas de las bacterias causantes de mastitis pueden doblar su población cada 30-40 minutos por lo que se requiere un reclutamiento muy rápido de neutrófilos (las principales células encargadas de controlar las poblaciones bacterianas) y anticuerpos opsonizantes en la leche, de modo que los patógenos intramamarios se eliminen antes de que su concentración provoque a una respuesta inflamatoria incontrolable. Lamentablemente, no siempre se puede mantener dicho ritmo y, de hecho, se ha observado una fuerte relación inversa entre la capacidad de reclutamiento de neutrófilos de la glándula mamaria y el desarrollo de una infección intramamaria. En consecuencia, el correcto funcionamiento del sistema neutrófilos/anticuerpos opsonizantes es crítico para la prevención o la minimización de los síntomas locales y sistémicos de infección (Burton y Erskine, 2003). Asimismo, la población de linfocitos y macrófagos residentes en la glándula mamaria juega un papel muy importante en el mantenimiento del citado sistema.

En este mismo sentido, la tasa de reclutamiento de neutrófilos hacia la glándula mamaria es muy baja en el momento del parto, por lo que el riesgo de sufrir una infección intramamaria es particularmente elevado en los tres primeros meses de vida del niño (Contreras y Rodríguez, 2011). Entre el tercer y el sexto mes, el reclutamiento cada vez es mayor, de tal manera que el riesgo se va reduciendo paulatinamente y llega a ser mínimo a partir del sexto mes. En ese momento, los neutrófilos pasan a ser mayoritarios dentro de las células del sistema inmunitario existentes en la glándula mamaria. En otras palabras, a partir del tercer/cuarto mes, nuestro sistema inmunitario empieza a colaborar activamente en el control de las mastitis (Jiménez *et al.*, 2009) (Figura 20).



**Figura 20.** Riesgo de infección intramamaria durante la lactancia en función de la capacidad de reclutamiento de neutrófilos (PMN) de la glándula mamaria. LT: linfocitos T; Mφ: macrófagos; RCS: recuento de células somáticas. Fuente: Fernández y Rodríguez (2014)

#### II.4.1.2. Factores de las bacterias implicadas en la mastitis

El ecosistema mamario resulta adecuado para la colonización y el crecimiento de muchas especies bacterianas durante la lactancia y este proceso de co-evolución ha conducido a un estado de aceptación o tolerancia mutua, como ocurre en todos los

ecosistemas microbianos del cuerpo humano. Sin embargo, cualquier alteración de este equilibrio puede conducir a una infección (van Belkum *et al.*, 2009; van Belkum, 2011; Otto, 2014). Es importante resaltar que la capacidad para colonizar y, eventualmente, infectar un hospedador no depende sólo de la especie bacteriana sino de las propiedades (presencia de factores de virulencia, formación de *biofilms*, resistencia a antimicrobianos) de cada cepa dentro de una especie determinada.

Existen dos hechos fisiológicos que permiten que algunas bacterias (especialmente, estafilococos y estreptococos) que se encuentran normalmente en la glándula mamaria durante la lactancia puedan alcanzar concentraciones muy elevadas en un tiempo muy breve si fallan los mecanismos de control de sus poblaciones. En primer lugar, son los microorganismos con mayor capacidad para crecer en sistemas de conductos, independientemente de que sean conductos naturales o artificiales. En ese sentido, es bien conocido que *S. epidermidis* representa la primera causa de infecciones hospitalarias, generalmente asociadas a catéteres y dispositivos similares (Piette y Verschraegen, 2009; Fey y Olson, 2010; Wojtyczka *et al.*, 2014; Büttner *et al.*, 2015). Por lo tanto, la glándula mamaria representa un ecosistema ideal para su crecimiento y para la formación de *biofilms*. En segundo lugar, los estafilococos y estreptococos son las bacterias con sistemas más eficientes para utilizar la lactosa, es decir, se encuentran en un hábitat ideal y con nutrientes que favorecen su crecimiento selectivo.

Aparte de estos hechos fisiológicos, entre las bacterias que se aíslan habitualmente en la leche humana, los estafilococos y los estreptococos poseen diversos mecanismos que les permiten crecer hasta alcanzar concentraciones que superan los límites normales. Por ejemplo, algunas cepas de *S. aureus* y ECN causantes de mastitis intramamarias son capaces de producir superantígenos (Larsen *et al.*, 2002; Günaydin *et al.*, 2011; Fijałkowski *et al.*, 2013), un mecanismo que permite evitar la respuesta del sistema inmunitario. Los superantígenos (SAGs) son exotoxinas (toxina del choque tóxico, toxinas exfoliativas, enterotoxinas, etc.) que exhiben una elevada capacidad mitogénica sobre los linfocitos T (Llewelyn y Cohen, 2002; Alouf y Müller-Alouf, 2003; Xu y McCormick, 2012; Stach *et al.*, 2014). En comparación con una respuesta inducida por un antígeno normal, en la que únicamente se activan un 0,001-0,0001% de los linfocitos T (aquellos con alta especificidad frente a ese antígeno), los SAGs son capaces de activar de una forma inespecífica hasta un 20-25% de los linfocitos T de un organismo. Este hecho provoca una respuesta inmunitaria tan masiva como ineficaz. A su vez, tal activación produce una liberación masiva de diversas citoquinas, que se traduce en una serie de síntomas clínicos como fiebre, escalofríos, náuseas, etc. Por otra parte, los SAGs de *S. aureus* también alteran las respuestas de los linfocitos B (Silverman y Goodyear, 2006). Probablemente, este tipo de mecanismos explica la dificultad o la imposibilidad de lograr una curación definitiva en un pequeño porcentaje de casos de mastitis infecciosas bien diagnosticadas.

No obstante, no todas las cepas de *S. aureus* implicadas en mastitis poseen la misma virulencia. Hasta la fecha, se han identificado siete islotes genómicos de patogenicidad (vSa) en esta especie que portan, aproximadamente, la mitad de los genes responsables de la producción de toxinas y otros factores de virulencia. Las variaciones en el potencial patogénico de las cepas de esta especie dependen, en gran medida, de las variaciones alélicas en los genes de virulencia, de la presencia o ausencia de vSas y de la presencia de SNPs en genes clave. Estas variaciones son la principal causa de las diferencias con relación a la resistencia a antibióticos y a la virulencia entre las cepas de *S. aureus* (Gill *et al.*, 2005). Se ha observado que, entre 111 aislados de infecciones intramamarias en búfalas, la combinación de ciertos genes asociados a la patogenicidad (*ebp*, *fib*, *fnbB*, *bbp*, *map*, *tetK*, *msrB*, *aacA-D*) fue específica de cada cepa (Kumar *et al.*, 2011). Otros estudios (que incluían abordajes genómicos y proteómicos) han encontrado diferencias en el patrón de factores de virulencia y de resistencia a antibióticos entre cepas aisladas tanto de mastitis humanas como bovinas (Delgado *et al.*, 2011; Wolf *et al.*, 2011).

La producción de SAgS no parece exclusiva de *S. aureus*. En este sentido, varios estudios han demostrado recientemente la presencia de combinaciones distintas de genes que codifican SAgS entre aislados pertenecientes a 11 especies de ECN, todos ellos aislados de mastitis bovinas (Park *et al.*, 2011; Fijałkowski *et al.*, 2014). Este aspecto no se ha estudiado hasta la fecha con relación a los ECN causantes de mastitis humanas.

Una comparación entre las propiedades de 200 cepas de *S. epidermidis* aisladas de mastitis humanas y las de 105 aisladas de mujeres sanas reveló que el número de cepas que contenía el gen *icaD* (relacionado con la formación de *biofilms*) y que mostraban resistencia a la oxacilina, eritromicina, clindamicina y mupirocina era significativamente mayor entre las cepas implicadas en mastitis (Delgado *et al.*, 2009b).

Además, algunas cepas bacterianas causantes de mastitis podrían tener otro mecanismo para evadir al sistema inmunitario: mimetizarse con el hospedador. Es decir, tendrían capacidad para “copiar” o interaccionar con ciertas secuencias que forman parte de los antígenos del hospedador y, más concretamente, de los antígenos leucocitarios humanos (HLA, del inglés *Human Leukocyte Antigen*) (Ebringer y Wilson, 2000). Esta hipótesis tendrá que ser confirmada en el futuro, pero ya se han descrito relaciones entre infecciones estafilocócicas y estreptocócicas con ciertos HLAs (Nooh *et al.*, 2007; Girschick *et al.*, 2008).

Diversos microorganismos poseen mecanismos para controlar las respuestas inmunitarias de sus hospedadores basados en la interacción con los receptores de tipo *Toll* (*Toll-like receptors* o TLRs). Los TLR son un componente esencial de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa y juegan un papel crucial en la defensa del organismo frente a la infección, ya que reconocen patrones moleculares expresados por

un amplio espectro de agentes infecciosos, desencadenando respuestas dirigidas a eliminarlos y a desarrollar memoria inmunológica (Kawai y Akira, 2010). La modulación de la señalización intracelular que desencadenan los TLR es un área de investigación muy activa que permitirá establecer terapias adecuadas para la sepsis y enfermedades de carácter inmunológico (Foley *et al.*, 2015). Algunos estudios han demostrado que la señalización a través de TLR2 (el receptor clave responsable de mediar en las interacciones entre el hospedador y las bacterias Gram-positivas) es fundamental en las infecciones por *S. aureus* debido a las interacciones que este receptor establece con los componentes mayoritarios (ácido lipoteicoico y péptidoglicanos) de su pared celular (Fournier y Philpott, 2005). En consecuencia, cualquier compuesto que interfiera con esta vía (como anticuerpos anti-TLR2) tiene potencial para ser usado como agente terapéutico frente a infecciones por estafilococos y otras bacterias Gram-positivas, en combinación con probióticos o antibióticos adecuados (Peres *et al.*, 2015).

Cuando los monocitos interactúan con los antígenos durante una infección, se pueden convertir en células dendríticas (CDs) (las células presentadoras de antígenos más potentes), que expresan altos niveles del HLA-DR y otras moléculas co-estimuladoras (como CD86 o proteína B7.2). Tras la interacción de los linfocitos T con estas CDs activadas, se generan fuertes respuestas que promueven la inmunidad humoral y la celular, lo que conduce frecuentemente a una inmunoprotección. Sin embargo, cuando los monocitos/macrófagos interactúan con ciertas bacterias, como *S. aureus* (que causa infecciones recurrentes), se producen elevados niveles de IL-10 y de citoquinas inductoras de respuesta Th17 (IL-6 e IL-23) pero no de IL-2 (necesario para una respuesta eficaz) (Wang *et al.*, 2012). Los niveles elevados de IL-10 pueden inhibir la respuesta inmunitaria innata mediante la disminución de la liberación de citoquinas inflamatorias y, simultáneamente, mediante la inhibición de la presentación de antígenos debido a una modulación negativa del HLA-DR, de CD86 y de otras moléculas co-estimuladoras. Paralelamente, se produce una fuerte inducción del ligando de la molécula de *muerte* programada 1 (PD-L1) que confiere a *S. aureus* un control multi-dimensional de las respuestas adaptativas (Wang *et al.*, 2012).

En resumen, resulta evidente que *S. aureus* (y posiblemente otras especies que causan infecciones humanas recurrentes o persistentes) puede interferir no sólo con las respuestas inmunitarias innatas sino también con las respuestas adaptativas mediadas por células T a través de varios mecanismos simultáneos: (a) modulación negativa de HLA-DR y CD86 mediada por la citoquina IL-10; (b) inducción de PD-L1; y (c) inhibición de las respuestas IL-2 de las células T. Por ello, se ven afectadas tanto las respuestas de base humoral como las de base celular y, de este modo, se produce un estado de inmunosupresión y una ausencia de respuestas inmunitarias eficaces durante y después de la infección, de ahí que se trate de infecciones persistentes y recurrentes.

Asimismo, se sabe que muchas especies de *Streptococcus* que pueden estar implicadas en mastitis tienen capacidad para producir proteasas que degradan las inmunoglobulinas, blindándose frente a este mecanismo de defensa de nuestro cuerpo (Poulsen *et al.*, 1998).

#### **II.4.1.3. Factores relacionados con la historia médica de la madre previa al embarazo**

Muchos aspectos relacionados con la historia médica de la madre apenas se han analizado en relación con el riesgo de padecer mastitis, pero, indudablemente, su estudio permitirá saber desde el inicio del embarazo que mujeres presentan mayor predisposición para dicha enfermedad, con el fin de establecer programas de prevención adecuados.

El vínculo entre la mastitis y otro tipo de infecciones es un aspecto relevante a tener en cuenta. En este sentido, el hecho de que los ecosistemas microbianos que habitan en el cuerpo humano constituyan una red de comunidades interrelacionadas que experimentan un intercambio constante (Costello *et al.*, 2009), podría explicar por qué los patógenos implicados en infecciones urinarias o faríngeas, entre otras, podrían alcanzar la glándula mamaria y, del mismo modo, aquellos implicados en el desarrollo de mastitis podrían afectar a la garganta o al sistema urinario. Por otra parte, el tratamiento antibiótico que se utiliza de forma habitual para combatir muchas infecciones puede afectar a la microbiota de la glándula mamaria y propiciar la aparición de mastitis. Del mismo modo, los antibióticos de amplio espectro que se usan para tratar las mastitis están asociados a una gran variedad de efectos adversos, como la candidiasis vaginal y las infecciones urinarias (Pirota y Garland, 2006). En este sentido, cualquier factor que afecte al equilibrio de las comunidades microbianas del organismo puede resultar clave para la salud (Turnbaugh *et al.*, 2007).

También se ha observado que las infecciones de piel como eczemas o psoriasis están relacionadas con una alteración en su microbioma (Trivedi, 2012; Weyrich *et al.*, 2015). De hecho, más del 90% de pacientes con eczema presentan un sobrecrecimiento de *S. aureus* en la piel que altera el equilibrio de su comunidad microbiana normal (Grice y Segre, 2011). Por tanto, es evidente que las bacterias implicadas en las infecciones cutáneas podrían jugar también un importante papel en la mastitis.

La posible asociación entre anemia y mastitis no se había contemplado hasta la fecha. Evidentemente, las mujeres con anemia son más vulnerables a las infecciones, pero también es interesante tener en cuenta que los suplementos de hierro que se prescriben frecuentemente durante el embarazo y la lactancia, podrían favorecer la multiplicación y virulencia de *S. aureus* y otros patógenos implicados en la mastitis infecciosa (Lowy, 2011), de modo que las mujeres con anemia serían más proclives a su padecimiento. Si bien hasta la fecha no hay estudios clínicos que evalúen el impacto de



estos suplementos en pacientes con mastitis, el estudio de las vías de adquisición del hierro por las bacterias destaca como una interesante área de investigación para definir los mecanismos relacionados con la severidad de esta infección (Le Maréchal *et al.*, 2011).

Varias investigaciones epidemiológicas han resaltado que una historia de mastitis en lactancias previas incrementa el riesgo de padecer esta patología de forma determinante (Foxman *et al.*, 2002, Kinlay *et al.*, 2001). Este hecho puede explicarse desde distintos puntos de vista. Por una parte, una glándula mamaria sana depende de una interacción adecuada entre el hospedador y su microbiota, que puede contener desde microorganismos probióticos hasta otros potencialmente infecciosos (Hunt *et al.*, 2011; Fernández *et al.*, 2013). Hay que destacar que el perfil de especies bacterianas que contiene la leche materna es específico de cada hospedador (Hunt *et al.*, 2011; Martín *et al.*, 2007a; Cabrera-Rubio *et al.*, 2012) y, por tanto, puede haber microbiotas mamarias más propensas al padecimiento de mastitis. Por otra parte, las diferencias en el perfil y concentración de varias proteínas y oligosacáridos de la leche humana implicados en el sistema inmune de las mucosas (Chichlowski *et al.*, 2011; Jeong *et al.*, 2012, Liu y Newburg, 2013), podrían explicar también que unos hospedadores presenten mayor susceptibilidad que otros al desarrollo de mastitis. Estos aspectos se tratarán con mayor profundidad en el apartado relativo a factores protectores frente a la mastitis (apartado II.4.2).

Los antecedentes familiares de mastitis podrían ser también un factor de riesgo significativo, lo que implicaría una predisposición genética en su desarrollo. De hecho, la base genética que determina las respuestas del hospedador a las bacterias implicadas en la mastitis ya se ha documentado en ganado vacuno y ovino (Hameed *et al.*, 2006; Bonnefont *et al.*, 2011), si bien los mecanismos y genes implicados están todavía por descubrir. Asimismo, las interacciones entre el sistema inmune del hospedador y los patógenos implicados en la mastitis parecen tener una importante relevancia en su etiopatogenia. En este sentido, el papel del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) en la respuesta inmune es un relevante candidato para estudiar las asociaciones entre genes y resistencia o susceptibilidad a la mastitis, porque la mayoría de los productos de sus genes están relacionados con la respuesta del hospedador (Rupp y Boichard, 2003). Por otra parte, como se ha comentado previamente (apartado II.4.1.1), ya se ha descrito la primera asociación entre la mastitis granulomatosa causada por *Corynebacterium kroppenstedtii* y un SNP (Bercot *et al.*, 2009) relacionado con la presencia de la enfermedad. Estos interesantes temas abrirán en un futuro próximo nuevos campos de investigación en la mastitis humana.

#### II.4.1.4. Factores relacionados con el embarazo, el parto y el posparto

Entre los factores de riesgo de la mastitis humana, el uso de antibióticos durante el embarazo y el parto está emergiendo como un aspecto que debe ser considerado. Las razones que inducen a su utilización y sus consecuencias negativas en la salud materno-infantil cuando se emplean sin una indicación clara se contemplan en este apartado.

El nivel de exposición a antibióticos durante el periparto en los países desarrollados es habitualmente muy elevado, ya que suelen administrarse para indicaciones tales como la cesárea, la prevención de la sepsis por el estreptococo del grupo B (EGB), el parto prematuro o el tratamiento procesos infecciosos que pueden acontecer durante el embarazo como las infecciones genitourinarias (Martínez de Tejada, 2014). Consecuentemente, prácticas como las cesáreas o la profilaxis intraparto para evitar la sepsis por EGB, tienen un impacto muy notable sobre la colonización intestinal del niño y el desarrollo de la microbiota mamaria.

En 1985, la Organización Mundial de la Salud declaró que no existía justificación médica para que las tasas de cesáreas fuesen mayores del 10-15% en cualquier región del planeta (WHO, 1985). No obstante, las cesáreas son cada vez más frecuentes tanto en países desarrollados como en países en desarrollo y algunos autores hablan de una auténtica epidemia de cesáreas en los primeros (Savage, 2000). En España, la tasa de cesáreas, considerada un indicador clave de la calidad del sistema sanitario, se ha incrementado ostensiblemente durante los últimos años mostrando un aumento del 9,5% desde 2001 a 2011 (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2013). Un estudio reciente, que analiza la situación en 111 hospitales españoles, estableció un porcentaje global de cesáreas del 25,4%, que en hospitales privados ascendió hasta 32,3% y 89,2% en mujeres sin y con cesárea previa, respectivamente (Redondo *et al.*, 2013).

La cesárea, cuando está justificada desde el punto de vista médico, es eficaz para prevenir la mortalidad y morbilidad perinatal. Sin embargo, no están demostrados los beneficios del parto por cesárea para las mujeres o los neonatos cuando este procedimiento se realiza de forma innecesaria. Como en cualquier otra cirugía, la cesárea está asociada a riesgos a corto y a largo plazo que pueden perdurar durante muchos años después de la intervención y afectar a la salud de la mujer y del neonato, así como a cualquier embarazo futuro. En este sentido, los gobiernos y los profesionales de la salud han expresado su preocupación en relación con el incremento en el número de partos por cesárea y las posibles consecuencias negativas para la salud materno-infantil; no obstante, el establecimiento de una tasa óptima de nacimientos por cesárea sigue siendo controvertido y, en este sentido, una declaración reciente de la Organización Mundial de la Salud reconoce la necesidad de revisar la tasa recomendada en 1985 (WHO, 2015).

Las cesáreas implican la aplicación de antibióticos de amplio espectro por vía intravenosa, lo que conlleva una alteración en la colonización del intestino del neonato, como han puesto de manifiesto estudios que han analizado el papel de la forma de nacimiento (parto vaginal frente a cesárea) en dicha colonización (Salminen *et al.*, 2004; Huurre *et al.*, 2008; Biasucci *et al.*, 2010; Jakobsson *et al.*, 2014). Estos estudios indican que el nacimiento por cesárea altera la colonización del intestino del niño, le priva del contacto con ciertos grupos microbianos y, en consonancia con la Teoría de la Higiene, provoca que el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal no madure correctamente (Neu y Rushing, 2011). Consecuentemente, como ya han demostrado muchas investigaciones, los niños nacidos mediante esta técnica quirúrgica presentan un riesgo significativamente mayor de padecer asma y otros procesos alérgicos (Renz-Polster *et al.*, 2005; Koplin *et al.*, 2008; Thavagnanam *et al.*, 2008; Joffe y Simpson, 2009), así como otras enfermedades relacionadas con alteraciones del sistema inmunitario (Romero y Korzeniewski, 2013). Asimismo, se ha sugerido que la alteración de la colonización intestinal del neonato debido al uso de antibióticos durante el embarazo y el parto por cesárea, puede estar asociada con un mayor riesgo de obesidad en el futuro (Huh *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; Mueller *et al.*, 2015).

La profilaxis intraparto es otro aspecto relevante a analizar por su impacto en la microbiota de la glándula mamaria, así como en la microbiota intestinal del neonato. En los años 70, *Streptococcus agalactiae* o estreptococo del grupo B (EGB) emergió como la principal causa de sepsis neonatal precoz, con una incidencia de 2-3 casos por cada 1.000 nacimientos y una tasa de mortalidad que inicialmente alcanzaba el 50% y ha descendido a 4-6% en la actualidad gracias a los avances en atención neonatal (Verani *et al.*, 2010). Para disminuir su incidencia y la tasa de mortalidad asociada, se puso en marcha en algunos países (incluyendo EEUU o España) el escrutinio universal de las mujeres entre la semana 35 y 37 de embarazo, que consiste en la investigación de la presencia de EGB en una muestra vagino-rectal, y la administración de profilaxis antibiótica intraparto a aquellas mujeres colonizadas con este microorganismo o en las que no se disponga del resultado del cultivo (Verani *et al.*, 2010; American Academy of Pediatrics, 2011; Cagno *et al.*, 2012; Alós Cortés *et al.*, 2013). Otras indicaciones en las que se efectúa la profilaxis intraparto son la detección de EGB en orina durante la gestación, haber tenido previamente un hijo con infección neonatal por EGB, rotura de membranas prolongada (> 18 h) o fiebre intraparto ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) (Alós Cortés *et al.*, 2013). En algunos países como Holanda o Reino Unido, la profilaxis intraparto se realiza exclusivamente en grupos de riesgo que presenten alguna de las indicaciones anteriores (Royal College of Obstetricians and Gynaecologists, 2012).

Desde la protocolización de la profilaxis intraparto en EEUU y España, entre otros países, la incidencia de las sepsis por EGB ha disminuido sensiblemente, desde 1,7/1.000 nacidos vivos (comienzos de los años 90) hasta 0,34-0,37/1.000 en años recientes en EEUU (Verani *et al.*, 2010). En España, un estudio realizado en 10 hospitales del área de Barcelona señala la disminución de la incidencia desde

1,92/1.000 nacidos vivos en 1994 hasta 0,26/1.000 en 2001 (Andreu *et al.*, 2003). Sin embargo, los EGB forman parte de la microbiota fisiológica del tracto intestinal y/o vaginal de entre un 4 y un 40% de las mujeres, con diferencias en la prevalencia asociadas al tipo de muestra, técnica de cultivo y población estudiada (Regan *et al.*, 1991), habiéndose propuesto cifras en España de aproximadamente un 20% (Mazón *et al.*, 2000). En este sentido, y a pesar de que la tasa de transmisión de madres portadoras de EGB a niños puede ser de hasta un 75%, solo el 1-2% de los niños nacidos de mujeres EGB-positivas que no reciben profilaxis desarrollan sepsis (Edwards *et al.*, 2006). Asimismo, los resultados de una revisión sistemática realizada recientemente indican que la protocolización de la profilaxis intraparto, *per se*, no ha contribuido significativamente a la reducción de la tasa de mortalidad neonatal debida a las infecciones por EGB (Ohlsson y Shah, 2014).

De hecho, en los países europeos en los que no se evalúa la presencia de EGB en las mujeres durante el embarazo, como el Reino Unido, la tasa de sepsis presenta cifras similares a las de EEUU, a pesar de que las cifras de colonización materna por EGB son similares (Heath *et al.*, 2004). Estos datos indican que los avances en el manejo de los niños prematuros (el grupo más afectado por las sepsis) ha sido el factor que realmente ha permitido una reducción de las tasas de sepsis tempranas por EGB.

En consecuencia, este protocolo se está aplicando a un número desproporcionadamente elevado de parejas madre-hijo. En el Reino Unido e Irlanda, un análisis de las sepsis por EGB ocurridas en los cerca de 800.000 nacimientos acontecidos en un año (con aproximadamente 198.000 mujeres colonizadas por EGB y una tasa de sepsis de 0,7/1.000 nacimientos) indica que habría que tratar hasta 840 mujeres EGB positivas para evitar un solo caso de sepsis neonatal (Heath *et al.*, 2004). Tras este análisis, declinaron introducir el escrutinio de EGB durante el embarazo. Desafortunadamente, el riesgo cero no existe, pero es de extrema importancia elegir una estrategia para detectar adecuadamente los casos de mayor riesgo que deberían recibir la profilaxis intraparto, aquellas mujeres colonizadas con EGB que presentan un parto prematuro. En este sentido, sería necesaria la aplicación de técnicas rápidas y sensibles como la detección de EGB por PCR intraparto, que presenta al menos la misma sensibilidad que el escrutinio universal durante el embarazo, y cuenta con la ventaja de identificar aquellas mujeres que realmente son portadoras del EGB en ese momento (Martínez de Tejada *et al.*, 2011; Daniels *et al.*, 2011; Di Renzo *et al.*, 2015). No obstante, la aplicación de esta técnica no evitará el hecho de que 20-30% de las mujeres reciban antibióticos *in utero*, por lo que la mejor estrategia sería el desarrollo de una vacuna preventiva frente al EGB (Rappuoli y Black, 2013) a pesar de que todos los intentos han sido infructuosos hasta la fecha.

La antibioterapia intravenosa durante el parto no es un tratamiento inocuo sino que conlleva ciertos efectos secundarios indeseables para la madre y para el hijo, como se ha mencionado previamente en relación al parto por cesárea, ya que en ambos

procedimientos se emplean antibióticos de amplio espectro. En el caso del niño, provoca el desarrollo de una microbiota anómala (Ubeda y Pamer, 2012; Arbolea *et al.*, 2015) con la consecuente predisposición al desarrollo de enfermedades caracterizadas por alteraciones en la respuesta del sistema inmunitario (Risnes *et al.*, 2011; Ubeda y Pamer, 2012; Francino, 2014; Wohl *et al.*, 2015). En el caso de la madre, se produce una disbiosis en sus microbiotas intestinal, vaginal y mamaria, siendo un factor de riesgo para el desarrollo de mastitis durante la lactancia (Delgado *et al.*, 2009a; Soto *et al.*, 2014).

La glándula mamaria se coloniza con bacterias (estafilococos, estreptococos, bacterias lácticas, bifidobacterias, etc.) procedentes del intestino materno durante el último tercio del embarazo (Rodríguez *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2013) y, entre ellas, un pequeño porcentaje de estreptococos y estafilococos posee genes de resistencia a antibióticos. Al aplicar el antibiótico, se genera una disbiosis de la microbiota mamaria, de tal manera que desaparecen las bacterias sensibles y se seleccionan las resistentes, que crecen sin competencia y alcanzan concentraciones muy superiores a las normales, conduciendo a una mastitis infecciosa (Delgado *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009b; Contreras y Rodríguez, 2011). Las mastitis asociadas a antibioterapia suelen ser más precoces que las “tradicionales”, pudiendo aparecer los primeros síntomas incluso entre el primer y el séptimo día posparto. Como se ha indicado en el apartado relativo al tratamiento de las mastitis (apartado II.3.5), los antibióticos pueden favorecer la aparición de mastitis agudas pero, sobre todo de las subagudas. Este hecho se debe, básicamente, a que las cepas de *S. epidermidis* implicadas suelen ser resistentes a numerosos antibióticos, incluyendo los que tradicionalmente se han empleado para el tratamiento de las mastitis. En este sentido, los *biofilms* que forma esta especie le blindan, no sólo frente a los ataques del sistema inmunitario, sino también frente al tratamiento con antibióticos (Sahal y Bilkay, 2014). El espectacular aumento de cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina causantes de mastitis también es consecuencia del uso habitual de antibióticos de amplio espectro (Reddy *et al.*, 2007; Schoenfeld y McKay, 2010; Holmes y Zadoks, 2011).

Igualmente, el incremento en las poblaciones de *St. agalactiae* resistentes a los antibióticos que se utilizan en la profilaxis intraparto está aumentando de manera preocupante, lo que supone un problema relevante de Salud Pública que necesita una vigilancia adecuada (Chu *et al.*, 2007; Boswihi *et al.*, 2012; Capanna *et al.*, 2013). Dada la naturaleza evolutiva de los mecanismos de resistencia a antibióticos, también inquieta la posibilidad de un aumento de las sepsis neonatales causadas por ciertas bacterias que pueden ocupar el nicho de los EGB (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., estreptococos del grupo A, *S. aureus* y *S. epidermidis* resistentes a meticilina, *Clostridium difficile*, etc.), tendencia que ya se ha observado en sepsis por *E. coli* en niños prematuros (Bizzarro *et al.*, 2008). También es importante tener en cuenta que la selección de bacterias resistentes a los antibióticos pueden comprometer el éxito de la antibioterapia en infecciones que pudieran padecer estos niños en el futuro.

Un reciente informe de la OMS (WHO, 2014), plantea una profunda preocupación relativa al aumento de la resistencia a antibióticos que debería combatirse a escala global con el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico y mejores estrategias para la prevención y tratamiento de enfermedades. En este sentido, sería importante que el campo de la obstetricia se haga eco de esta necesidad, ya que si bien algunas indicaciones presentan razones de peso para justificar el uso de antibióticos, los riesgos potenciales a largo plazo que conlleva su utilización excesiva podrían superar sus beneficios, y por tanto son necesarios estudios para evaluar adecuadamente sus consecuencias (Martínez de Tejada, 2014).

En relación con la anestesia epidural durante el parto, varios autores han debatido su vínculo con las dificultades durante la lactancia (Camann, 2007; Loubert *et al.*, 2011; Lind *et al.*, 2014), lo que podría ser un factor predisponente para la mastitis, si bien la falta de una evidencia clara indica la necesidad de realizar más investigaciones (Montgomery *et al.*, 2012). Un estudio epidemiológico que incluyó 772 madres con partos vaginales a término de niños sanos, encontró una asociación entre la anestesia epidural y el abandono de la lactancia durante el primer mes tras el nacimiento (Dozier *et al.*, 2013). Los autores consideraron varios mecanismos para explicar dicha asociación, como la influencia negativa de los medicamentos en el establecimiento de una succión eficaz o los niveles bajos de oxitocina tras la anestesia epidural, que comprometerían la interacción entre la madre y el neonato; no obstante, podrían haber otros muchos factores implicados por lo que sería necesario realizar más estudios.

#### **II.4.1.5. Factores relacionados con la lactancia**

El riesgo de padecer mastitis se incrementa bajo cualquier circunstancia que interfiera con el establecimiento y desarrollo de la lactancia, incluyendo un retraso en el primer contacto madre-hijo o su separación prolongada tras el nacimiento, debido a una hospitalización o por cualquier otro motivo. Las primeras horas después del parto son cruciales para que se establezca la interacción madre-hijo y la lactancia progrese adecuadamente (Cantrill *et al.*, 2014; Forster *et al.*, 2015).

Una posición incorrecta del bebé y un agarre inadecuado durante el amamantamiento se han identificado como aspectos que pueden obstaculizar la lactancia y provocar dolor (Morland-Schultz y Hill, 2005; Dennis *et al.*, 2014). Además, estos factores se han asociado con la aparición de grietas y mastitis en varios estudios (Coca *et al.*, 2009; Goyal *et al.*, 2011), ya que están relacionados con un incorrecto vaciamiento de la glándula mamaria que podría intervenir en el desarrollo de dicha enfermedad. Si bien las grietas se suelen asociar a posturas inadecuadas durante la toma o a problemas anatómicos en el niño, no hay que descartar el papel de las bacterias implicadas en la mastitis, algunas de ellas con propiedades epidermiolíticas.

Una cantidad abundante de leche podría aumentar el riesgo de retención si el lactante se salta alguna toma o la retrasa (Vogel *et al.*, 1999) porque esta situación proporcionaría condiciones óptimas para el sobrecrecimiento bacteriano. Por el contrario, muchas lactantes tienen una falsa percepción de baja producción de leche (hipogalactia), una de las principales causas de abandono de la lactancia (Li *et al.*, 2008; Odom *et al.*, 2013; Lou *et al.*, 2014; Teich *et al.*, 2014). Como se ha comentado anteriormente (apartado II.3.2.1.2), en la mayoría de estos casos no está afectada la producción sino la secreción, debido a la formación de densas películas bacterianas en el interior de los conductos galactóforos (Contreras y Rodríguez, 2011; Delgado *et al.*, 2009b; Jiménez *et al.*, 2009). La percepción de una escasa cantidad de leche, unida a una larga duración de la toma, puede constituir el único síntoma indicativo de una mastitis subclínica, aspecto que merece ser investigado en el futuro.

Cualquier interferencia a la succión, como el uso de chupetes o biberones, puede ocasionar problemas durante la lactancia, por lo que su uso está contraindicado, al menos mientras el neonato está aprendiendo a succionar de manera correcta (*American Academy of Pediatrics-Section on Breastfeeding*, 2012). En el documento *Evidence for the Ten Steps to Successful Breastfeeding* (WHO, 1998), se desaconseja específicamente el uso de tetinas y chupetes a los lactantes con el fin de promover una lactancia exitosa. Aquellos lactantes que presentan una preferencia por el biberón experimentan importantes dificultades durante la lactancia, mientras que los que utilizan chupetes maman, en general, menos frecuentemente, lo que puede afectar negativamente a la producción de leche (Lawrence y Lawrence, 2008). Los chupetes y biberones también se han relacionado con una técnica de succión ineficaz y menor duración de la lactancia (Righard, 1998; Scott *et al.*, 2006). En contraste, un meta-análisis Cochrane no encontró una correlación entre el uso de chupete y la duración o la aparición de problemas durante la lactancia (Jaafar *et al.*, 2011), por lo que este tema es un motivo de controversia en la actualidad (Wellington y Prasad, 2012).

La presencia de anquiloglosia (frenillo) como factor que pueden interferir en la lactancia, así como los beneficios de la frenotomía, también es un tema intensamente debatido. Varios autores destacan los beneficios de la frenotomía para mejorar la lactancia y aumentar su duración cuando existen dificultades, señalando además que se trata de un procedimiento de cirugía menor que, aunque requiere sedación, raramente lleva a complicaciones (Edmunds *et al.*, 2011; Kumar y Kalke 2012; Dollberg *et al.*, 2014). Sin embargo, dos revisiones sistemáticas (Suter y Bornstein, 2009; Webb *et al.*, 2013) señalan que el número de estudios de calidad acerca de los beneficios de la frenotomía en la lactancia son limitados y son necesarios estudios prospectivos bien diseñados.

Cuando existen dificultades durante la lactancia, hay que explorar de forma global cualquier circunstancia que pueda influir en la aparición de la mastitis, como el frenillo o la posición del bebé, entre otras, sin olvidar que el análisis microbiológico de la leche

materna es un aspecto clave que se debe realizar paralelamente a la valoración de otros factores de riesgo (Contreras y Rodríguez, 2011).

El uso de bombas de extracción o sacaleches se recomienda para reducir la presión de la leche en el pecho y prevenir su estancamiento (Kinlay *et al.*, 2001; Balkman, 2010), resultando muy útiles cuando la cantidad de leche es abundante. Sin embargo, demasiada expresión de leche puede dar lugar a dolor debido a un estiramiento excesivo del pecho y, de hecho, el uso inapropiado de estos aparatos puede derivar en traumatismos y heridas en el pezón y se ha asociado con la mastitis en algunos estudios (Foxman *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2005; Rasmussen y Geraghty, 2011; Qi *et al.*, 2014). Además, puede constituir una fuente de microorganismos patógenos si no están adecuadamente esterilizadas (Brown *et al.*, 2005; Amir *et al.*, 2006; Marín *et al.*, 2009; Engür *et al.*, 2014).

El dolor en los pezones es un problema frecuente en el inicio de la lactancia que puede conducir a su abandono precoz (Odom *et al.*, 2013; Buck *et al.*, 2014; Amir *et al.*, 2015). Entre las causas que producen dolor, las grietas en los pezones destacan como un factor significativamente asociado con la mastitis en todos los estudios epidemiológicos realizados hasta la fecha (Kinlay *et al.*, 2001; Foxman *et al.*, 2002; Amir *et al.*, 2006; Amir *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2014), bajo la hipótesis de que una herida en el pezón proporciona una entrada a los microorganismos responsables de la infección. No obstante, estudios recientes sugieren que estas lesiones pueden ser un síntoma clínico de mastitis en vez de un factor predisponente; es decir, que en algunos casos las propias bacterias causantes de las mastitis podrían estar implicadas en su etiopatogenia (Delgado *et al.*, 2009b). En este sentido, las toxinas exfoliativas o epidermiolíticas son factor de virulencia relevante de *S. aureus* y otras especies de *Staphylococcus* que causan mastitis (Bukowski *et al.*, 2010); además, se ha observado que mujeres con una mayor concentración de ECN o estreptococos *viridans* en su leche presentan un mayor riesgo de lesiones en los pezones (Kvist *et al.*, 2008). En cualquier caso, la etiología de las grietas y los factores predisponentes o agravantes de las mismas deberían ser evaluados cuidadosamente ya que se trata de un problema particularmente doloroso para la madre.

La eficacia de distintos tratamientos para reducir el dolor asociado a las grietas o a la irritación del pezón ha sido evaluada en varias revisiones sistemáticas, pero los resultados no son concluyentes (Morland-Schultz y Hill, 2005; Vieira *et al.*, 2013; Dennis *et al.*, 2014). En este contexto, la aplicación de pomadas tipo lanolina o de la propia leche en los pezones tras las tomas son prácticas habituales pero no recomendables en caso de mastitis (Carrera *et al.*, 2012) (ver apartado II.3.5.7), ya que su uso puede estar asociado con una mayor incidencia de esta enfermedad (Kinlay *et al.*, 2001).



Entre los tratamientos que habitualmente se aplican en los pezones, la medicación antifúngica tópica se ha asociado con la mastitis previamente (Foxman *et al.*, 2002), ya que se prescribe a menudo para tratar la “candidiasis mamaria” diagnosticada exclusivamente mediante una valoración visual sin análisis microbiológico. Este hecho promueve que las mastitis se prolonguen sin mejoría del cuadro clínico e incluso con empeoramiento, debido a que no se trata adecuadamente la etiología bacteriana (Francis-Morril *et al.*, 2004; Hale *et al.*, 2009).

La posible relación de la antibioterapia con las mastitis ya ha sido contemplada detalladamente en el apartado anterior (II.4.1.4). No obstante, es importante insistir en que el tratamiento de las mastitis infecciosas debería instaurarse siempre que sea posible tras un análisis microbiológico que determine el agente causal y su sensibilidad a los antibióticos (Arroyo *et al.*, 2011; Carrera *et al.*, 2012). En aquellos casos en los que no sea posible se puede seguir la propuesta de abordaje terapéutico descrita previamente (apartado II.3.5).

## **II.4.2. FACTORES PROTECTORES**

Del mismo modo que hay factores que predisponen a las mastitis, con toda seguridad existen factores que protegen a la madre de este problema (Fernández y Rodríguez, 2014). Se trata de un campo prácticamente inexplorado pero que proporcionará numerosas sorpresas en el futuro debido al creciente interés que despierta la lactancia como una medida fundamental en materia de Salud Pública, a corto, medio y largo plazo (Ip *et al.*, 2009; U.S. Department of Health and Human Services, 2011; AAP-Section on Breastfeeding, 2012; Geddes y Prescott, 2013).

Los posibles factores protectores están fundamentalmente relacionados con la composición y la microbiota de la leche materna. También se han contemplado en este apartado algunos factores relacionados con las prácticas durante la lactancia y ciertas alternativas a los antibióticos que se utilizan para el tratamiento de las mastitis y podrían aplicarse en un futuro próximo para su prevención.

### **II.4.2.1. Factores relacionados con la composición de la leche materna**

Algunos componentes de la leche humana pueden tener un relevante papel en la protección frente a las mastitis, como es el caso de los HMOs, muy abundantes en este fluido, pero cuya composición puede variar dependiendo de cada mujer (Bode y Jantscher-Krenn, 2012; Prieto, 2012; Smilowitz *et al.*, 2013). Los HMOs poseen un gran espectro de propiedades biológicas que pueden ser muy relevantes para la salud materno-infantil (Bode, 2012; Musilova *et al.*, 2014). De hecho, ejercen una influencia decisiva en el proceso de adquisición de la microbiota intestinal del neonato como sustratos que favorecen el crecimiento bacterias comensales sacarolíticas y actuando como antimicrobianos que impiden la adhesión de patógenos por antagonismo con sus

receptores (Bode, 2012; Jost *et al.*, 2015). Recientemente se ha sugerido el posible papel de los HMOs en la prevención frente a la sepsis por el estreptococo del grupo B (Le Doare y Kampmann, 2014).

En particular, las interacciones proteína-carbohidrato, como aquellas mediadas por las selectinas, son particularmente susceptibles de ser moduladas por los HMOs. Las selectinas pertenecen a una subclase de proteínas de unión a carbohidratos implicadas en la adhesión de las células del sistema inmunitario, cuyos determinantes de unión se pueden detectar en varios HMOs, lo que sugiere que podrían actuar como análogos solubles de los ligandos de la selectina (Rudloff *et al.*, 2002).

Las selectinas son críticas para la formación de los complejos plaqueta-neutrófilo (PNC; del inglés, *Platelet-Neutrophil Complex*) (Larsen *et al.*, 1989). Cuando los neutrófilos se encuentran formando parte de estos agregados celulares heterogéneos, su capacidad para fagocitar y producir especies de oxígeno reactivo (ROS; del inglés, *Reactive Oxygen Species*) aumenta considerablemente (Peters *et al.*, 1997).

Los neutrófilos altamente activados tienen un gran potencial para causar daño en diversas infecciones ya que pueden generar respuestas inflamatorias muy exageradas mediante la infiltración de un número excesivo de leucocitos y la consiguiente sobreproducción de ROS. Esto es, precisamente, lo que puede suceder en las mastitis, especialmente en las agudas, caracterizadas por una intensa inflamación local. En el mismo sentido, se ha observado que la infiltración excesiva de leucocitos acelera la progresión de la enterocolitis necrotizante, una enfermedad prevalente en las unidades de cuidados intensivos neonatales. El daño en los tejidos afectados parece ser debido, en gran medida, a los ROS producidos por los neutrófilos, que propician la pérdida de la integridad de la mucosa intestinal y favorece la translocación por parte de microorganismos potencialmente patógenos (Hsueh *et al.*, 2003). En este sentido, se ha observado que los HMOs son capaces de reducir la formación de PNCs al actuar como análogos de los ligandos de la selectina (Bode *et al.*, 2004).

Por lo tanto, ciertos HMOs actúan claramente como agentes antiinflamatorios tanto en la glándula mamaria de la madre como en el intestino del niño amamantado. Los efectos inhibitorios de algunos HMOs sobre la extravasación de leucocitos, su activación y la formación de PNCs y ROS pueden explicar, al menos parcialmente, por qué la enterocolitis necrotizante es menos común en niños amamantados y por qué un porcentaje mayoritario de mujeres no padecen mastitis.

La aplicación de las técnicas proteómicas ha permitido un mejor conocimiento del proteoma implicado en la defensa de la glándula mamaria. Hettinga *et al.* (2011) pudieron identificar 268 proteínas en leche humana y 269 en leche bovina. Entre ellas, 44 de las humanas y 51 de las bovinas están directamente relacionadas con el sistema defensivo mamario y neonatal. En la leche humana destacaron las altas concentraciones de proteínas típicamente asociadas con el sistema inmunitario de las mucosas, como

inmunoglobulinas A, CD14, lactoferrina y lisozima. Las diferencias en el perfil de estas proteínas (y en sus concentraciones) en la leche de distintas mujeres puede ser también un factor que explique la diferente susceptibilidad a padecer mastitis.

Por otra parte, la glándula mamaria también se caracteriza por la producción de péptidos antimicrobianos eucariotas (también llamados péptidos de defensa del hospedador) durante la lactancia. Y este hecho también tiene una base genética, de tal manera que los polimorfismos en los genes que los codifican o las variaciones en su número de copias podrían estar ligados a una mayor o menor susceptibilidad a las mastitis (Rivas-Santiago *et al.*, 2009). En los últimos años se ha sugerido que estos péptidos antimicrobianos tienen un gran potencial en el área biomédica como agentes terapéuticos frente a enfermedades infecciosas (Lo y Lange, 2015). Precisamente, uno de los péptidos que se expresa en la glándula mamaria y se secreta en leche (catelicidina LL-37) posee actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas (incluyendo estafilococos y estreptococos) y Gram-negativas (Murakami *et al.*, 2005) y, lo que es particularmente relevante para las mastitis, posee un fuerte efecto anti-*biofilm* incluso a concentraciones subinhibitorias (Jacobsen y Jenssen, 2012).

La leche humana es muy rica en otros tipos de sustancias biológicamente activas y muchas de ellas también podrían jugar un papel protector, bien por sí solas o actuando de forma sinérgica (Ballard y Morrow, 2013; Pacheco *et al.*, 2015), lo que sin duda constituye un interesante campo de investigación para el futuro.

#### **II.4.2.2. Factores relacionados con la microbiota de la leche materna**

La composición de la microbiota de las distintas mucosas humanas no es homogénea, existiendo grandes diferencias interindividuales que pueden estar ligadas a una mayor o menor predisposición a las infecciones y a otro tipo de enfermedades. Recientemente, se ha observado que las personas se pueden clasificar en tres grandes enterotipos dependiendo del grupo de microorganismos dominantes en su microbiota intestinal (Arumugam *et al.*, 2011). Se trata de un hallazgo relevante con connotaciones clínicas evidentes que, a medio o largo plazo, podría contribuir a una medicina o a unos sistemas preventivos más individualizados.

La diversidad que presenta la microbiota mamaria (apartado II.2.1), como sucede con la microbiota intestinal y vaginal, tiene sin duda implicaciones durante la lactancia, ya que las especies bacterianas que dominan un ecosistema tienden a formar consorcios con otras especies concretas, de tal manera que se pueden formar microbiotas mamarias más o menos proclives al padecimiento de mastitis (Contreras y Rodríguez, 2011; Ma *et al.*, 2015).

La existencia de bacterias productoras de péptidos antimicrobianos (bacteriocinas) entre los integrantes de la microbiota mamaria también podría contribuir a un mejor

control de los agentes de mastitis infecciosas. En este sentido, la presencia de cepas de *Lactococcus lactis* productoras de nisina en la leche de algunas mujeres sanas resulta ilustrativo (Beasley y Saris, 2004). De hecho, la aplicación de esta bacteriocina ha resultado muy eficaz en casos de mastitis estafilocócicas humanas refractarias a la antibioterapia, teniendo además una notable capacidad para la cicatrización de grietas en el pezón (Fernández *et al.*, 2008). A diferencia de muchos antibióticos, la nisina y otras bacteriocinas son activas frente a la mayoría de las especies productoras de mastitis, incluyendo *S. aureus* o *S. epidermidis*, y dado que el modo de acción de antibióticos y bacteriocinas es muy diferente, es posible que en un futuro próximo éstas puedan suplir o complementar a los antibióticos en el tratamiento de las mastitis como se ha propuesto para la mastitis bovina (Pieterse y Todorov, 2010).

#### **II.4.2.3. Factores relacionados con la lactancia**

El amamantamiento inmediato tras el parto y el éxito durante el primer agarre también destacan como factores protectores frente a la mastitis (Mediano *et al.*, 2014), ya que una temprana interacción madre-hijo se asocia significativamente con una lactancia exitosa (Chien y Tai, 2007; de Araújo y Schmitz, 2007; Carberry *et al.*, 2013; Cantrill *et al.*, 2014).

La lactancia materna exclusiva también parece ser un factor de protección frente a la mastitis. No solo evita el uso de biberones, que suponen un factor de riesgo, sino que también proporciona una mejor interacción madre-hijo, incrementando la frecuencia de las tomas y contribuyendo a un adecuado vaciamiento de la mama.

En general, cualquier estrategia que evite los factores de riesgo descritos en el apartado II.4.1.5, contribuiría a la protección frente al desarrollo de mastitis.

#### **II.4.2.4. Estrategias para la prevención de las mastitis lactacionales basadas en la modulación de la microbiota mamaria**

El empleo de alternativas a los antibióticos (péptidos antimicrobianos, probióticos, etc.) es un campo de investigación que debe ser seriamente considerado dado el alarmante incremento en las tasas de resistencia entre los agentes infecciosos (Allen *et al.*, 2014). Algunas de estas alternativas, empleadas durante el embarazo y la lactancia para el tratamiento de infecciones leves o moderadas, podrían colaborar a reducir las tasas de mastitis.

Por otra parte, la modulación de la microbiota y del sistema inmunitario mamario durante el embarazo y la lactancia mediante probióticos podría ser estrategia muy útil para la prevención de las mastitis. En este sentido, varios estudios han demostrado previamente que ciertos lactobacilos aislados de leche humana representan una alternativa más eficaz que los antibióticos para el tratamiento de las mastitis subagudas

y subclínicas, careciendo de los efectos secundarios de aquellos (candidiasis, gastroenteritis, etc.) (Jiménez *et al.*, 2008c; Arroyo *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2014).

En esta línea de trabajo, la selección de cepas probióticas para prevenir la mastitis, se debe basar en criterios relacionados esta enfermedad, como su tropismo por la glándula mamaria o su actividad frente a estafilococos y estreptococos, entre otros agentes etiológicos de la mastitis. La eficacia y seguridad de la/s cepa/s seleccionada debe estar avalada por ensayos clínicos correctamente diseñados y dirigidos específicamente a la población diana (Rodríguez, 2015).

*III. Diversidad microbiana en la leche de mujeres con mastitis: papel potencial de los estafilococos coagulasa-negativos, estreptococos del grupo viridians y corinebacterias*

---

*III. Microbial diversity in milk of women with mastitis: potential role of coagulase-negative staphylococci, group viridans streptotocci and corynebacteria*

Manuscrito en preparación para  
*Breastfeeding Medicine*



### III.1. ABSTRACT

**Background:** Lactational mastitis constitutes a significant cause of premature weaning, however, its etiology, linked to the presence of pathogenic microorganisms, has been scarcely reported. Furthermore, the clinical relevance of some bacterial pathogens such as coagulase-negative staphylococci (CNS), viridans group streptococci and corynebacteria remains unclear.

**Methods:** In this study, 1,849 milk samples obtained from women with infectious mastitis were cultured in a variety of media (Baird Parker, Columbia Blood Agar, Sabouraud-Chloramphenicol, Kanamycin Aesculin Azide and Violet Red Bile Glucose). A total of 5220 isolates were identified by culture, biochemical and/or molecular methods at the species or genus level. A more precise identification at species level of a collection of 211 isolates belonging to CNS, streptococci, and coryneform bacteria was carried out by 16S rRNA gene sequencing.

**Results:** Mean total bacterial count in milk samples was  $4.11 \log_{10}$  CFU/mL (95% CI: 4.08-4.15). *S. epidermidis* was the most common species being isolated from 91.56% of the samples, while *S. aureus* was detected in 29.74%. Streptococci and corynebacteria constituted the second (70.20%) and third (16.60%) most prevalent bacterial groups found in this study. In contrast, *Candida* spp. was present in only 0.54% of the samples. Sequencing of the 16S rRNA gene revealed a high diversity of bacterial species among identified isolates.

**Conclusions:** This study shows that many coagulase-negative staphylococci, viridans group streptococci and corynebacteria, usually dismissed as contaminant bacteria, may play an important role as etiological agents of mastitis. Proper diagnosis of mastitis should be established only after performing microbiological testing of milk based on standardized procedures. A reliable analysis must identify the mastitis-causing pathogen(s) at species level and its(their) concentration(s).

**Keywords:** Lactational mastitis; breastfeeding, microbial diversity



## III.2. INTRODUCTION

Mastitis is a common condition during lactation and constitutes one of the main medical causes of premature weaning (WHO, 2000; Foxman *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2008). This condition should be considered a relevant public health issue since it deprives the mother-infant pair from the wide range of health benefits that breastfeeding provides (U.S. Department of Health and Human Services, 2011).

Several epidemiologic studies have been carried out to study the incidence and the potential risk factors that could be involved in human lactational mastitis (Kinlay *et al.*, 2001; Foxman *et al.*, 2002; Amir *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2008; Mediano *et al.*, 2014). However, the etiology of this condition has been scarcely reported, and the role of some bacterial pathogens remains unclear (Kvist *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009a).

It has recently been addressed that human mastitis is characterized by a dysbiosis process, leading to an overgrowth of certain bacterial species present in human milk (Delgado *et al.*, 2008; Contreras and Rodríguez, 2011; Fernández *et al.*, 2013). Therefore, microbiological analysis of human milk should be the only method for determining the etiology of mastitis and establishing an efficient treatment of this condition (Delgado *et al.*, 2008; Arroyo *et al.*, 2010; Contreras and Rodríguez, 2011). In practice, the bacteriological culture of human milk samples is not routinely performed and mastitis has usually been diagnosed based on often non-specific clinical symptoms, so that its true incidence and prevalence could be greatly underestimated (Barbosa-Cesnik *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2008; Contreras and Rodríguez, 2011). Furthermore, the lack of information about the antibiotic susceptibility of the etiological agent causing mastitis determines the use of broad spectrum antibiotics leading to a frequent failure in the empirical treatment and to increasing rates of antimicrobial resistance (Delgado *et al.*, 2011; Begović *et al.*, 2013).

*Staphylococcus aureus* has traditionally been considered the main etiological agent of human mastitis, since most diagnoses were based on visual assessment of the affected breast in acute cases (Osterman and Rahm, 2000; WHO, 2000; Amir *et al.*, 2006; Amir and Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee, 2014).

Nevertheless, recent studies have addressed the important role of coagulase-negative staphylococci (CNS), mainly *Staphylococcus epidermidis*, in those infections that usually remain subacute or subclinical (Delgado *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009b). In addition, different species of viridans group streptococci (VGS) and corynebacteria have also been isolated from milk of women suffering from mastitis and may play an important role in such infections (Delgado *et al.*, 2008; Arroyo *et al.*, 2010). The clinical relevance of CNS, VGS, and corynebacteria has been often questioned since many of them have been traditionally considered commensal microorganisms. However, they may behave as opportunistic bacteria frequently associated to duct-like structures (Otto, 2014), and, as a consequence, they can be an underrated cause of lactational mastitis.

In this context, the objective of this work was to describe the microbial diversity in 1,849 milk samples from women suffering from lactational mastitis and to identify a collection of 211 isolates at the species level by molecular-based methods (16S rRNA gene sequencing).

### III.3. METHODS

#### III.3.1. Milk samples

A total of 1,849 milk samples were obtained from women with clinical symptoms of infectious mastitis, who were referred to our laboratory by lactation consultants and midwives attending different health-care centers in Spain. All cases included either both local (breast redness, pain and engorgement) and systemic symptoms (fever or flu-like symptoms) or only local symptoms (pain, engorgement, reduced milk secretion). Informed consent to the protocol approved by the Ethical Committee of Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain) was obtained from the women that provided the biological samples of this study. Milk samples were obtained from each breast in case of bilateral mastitis or only from the affected breast if it was unilateral. Milk samples for microbial analysis were collected following the protocol proposed by Arroyo *et al.* (2011). Briefly, nipple and mammary areola were cleaned with soap and water and a milk sample (~1 mL) was collected aseptically in a sterile tube by manual expression after discarding the first drops. The use of milk pumps for sample collection was absolutely discouraged. The samples were kept at 4°C and processed within 8 h after collection.

#### III.3.2. Isolation and identification of culturable bacteria

Proper peptone water dilutions of the fresh milk samples were plated in duplicate onto ready-to-use Baird Parker (BP; a selective medium for staphylococci isolation), Columbia Blood Agar (CNA; a medium particularly suitable for isolation of streptococci, staphylococci and related bacteria), and Sabouraud-Chloramphenicol (SDC; a medium for yeast isolation) agar plates supplied by bioMérieux España (Madrid, Spain), and also onto Kanamycin Aesculin Azide (KAA; a medium for the isolation of enterococci) and Violet Red Bile Glucose (VRBG; a medium for the isolation of enterobacteria and other Gram-negative bacteria) agar plates supplied by Oxoid Ltd. (Basingstoke, UK) and Difco (Detroit, MI, USA), respectively. The plates were incubated at 37°C for 48 h with the exception of the SDC ones which in parallel were incubated at 25°C for 5 d. The isolates from the different culture media were initially examined by optical microscopy to determine their morphology and Gram

staining, and tested for catalase, oxidase and coagulase activities.

The isolates that, on the basis of culture medium and preliminary tests, seemed to belong to the genus *Staphylococcus* were identified as *S. epidermidis* or *S. aureus* by a multiplex polymerase chain reaction (PCR) method based on the *dnaJ* gene, using the primers J-StGen (5'-TGGCCAAAAGAGACTATTATGA-3'), J-StAur (5'-GGATCTCTTTGTCTGCCG-3'), and J-StEpi (5'-CCACCAAAGCCTTGACTT-3') as described by Jiménez *et al.* (2008). The primer pair J-StGen and J-StAur results in a 337 bp *S. aureus* species-specific fragment, and the primer pair J-StGen and J-StEpi results in a 249 bp *S. epidermidis* species specific fragment.

Microorganisms belonging to genus *Rothia* were isolated from CNA and identified by its biochemical profile. Most *Rothia* isolates were whitish to gray colonies, non-hemolytic, smooth, round, with a sticky and tenacious consistency due to the mucilaginous capsular material produced.

In relation to VGS, the presumptive VGS isolates were selected from CNA plates according to morphology, catalase, oxidase and coagulase activities and  $\alpha$ -hemolysis. Subsequently, they were submitted to a biochemical identification scheme based on Voges–Proskauer, arginine hydrolysis, bile aesculin hydrolysis and mannitol/sorbitol fermentation tests.

Presumptive identification of corynebacteria was carried out by Gram staining, hemolysis, catalase activity and other biochemical criteria. Gram stain usually shows Gram-positive rods in short chains (with “V” or “Y” configurations) or in palisades resembling “Chinese characters” (Bernard, 2012).

A more precise species identification of a collection of 211 isolates belonging to CNS and related species (62), streptococci (102) and coryneform bacteria (47) was carried out by 16S rRNA gene sequencing using primers pbl16 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and mlb16 (5'-GGCTGCTGGCACGTTAGT-3') as described by Kullen *et al.* (2000). The amplicons were purified using the Nucleospin® Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced at the Genomics Unit of the Universidad Complutense de Madrid, Spain. The resulting sequences were compared with those available in the NCBI GenBank database using the

BLAST algorithm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and the identity of the isolates was determined on the basis of the following scores:  $\geq 98\%$  identity for species level identification and 95% to 97% for genus level.

### III.3.3. Statistical analysis

Microbiological data, recorded as colony-forming units (CFU)/mL, were transformed to logarithmic values before statistical analysis. The reported values of bacterial counts are the mean and 95% confidence interval (CI) values of the mean. Proportions to determine associations between bacterial groups were compared using  $\chi^2$  statistics (significance level of 0.05) by StatGraphics Centurion XVI version 16.1.18 (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

Agglomerative hierarchical clustering of the microbiological data from individual milk samples and main bacterial groups was done using *agnes* (agglomerative nesting) function with the *euclidean distance* method (R package: *cluster*). Then, a heatmap representing bacterial counts of the milk samples was plotted. The Dice index was calculated for each pair-wise combination of main bacterial groups (presented in more than 10% of milk samples), and a co-occurrence matrix was constructed. Afterwards, a heatmap representing the values of co-occurrence indexes was constructed. Hierarchical clustering was done using Ward's criterion. Cluster analysis, Dice index calculation, and heatmap construction were performed using R 2.15.3 (R-project, <http://www.r-project.org>).

### III.4. RESULTS

#### III.4.1. Microbiological characterization of milk samples from women with mastitis

In this study, a total of 1,849 samples of milk obtained from women with clinical symptoms of mastitis were analyzed using culture-based methods. Bacterial growth was observed in all analyzed samples with a mean value of 4.11 log<sub>10</sub> CFU/mL (95% CI: 4.08–4.15) and ranging from 2.30 to 6.48 log<sub>10</sub> CFU/mL (Table 1). A total of 5,220 isolates were identified from mastitis cases (Table 1).

*Staphylococcus* group (including the related genera *Rothia* spp. and *Kocuria* spp.) was the most frequently isolated bacterial group; a total of 1,804 milk samples (97.57%) contained at least one isolate of this group (Table 1). The total staphylococcal counts found in the milk samples ranged from 1.70 to 6.48 log<sub>10</sub> CFU/mL. *S. epidermidis* was the most common species isolated from mastitis samples in this study and it was present in 91.56% of the samples, while *S. aureus* was detected in 29.74% of them. Other staphylococcal species were also isolated although in a significant lower number of samples (3.89%) (Table 1). The mean bacterial counts for *S. epidermidis* and *S. aureus* were 3.64 (95% CI: 3.60–3.68) and 3.53 log<sub>10</sub> CFU/mL (95% CI: 3.44–3.62), respectively. In the present study, *Rothia* spp. were identified in 28.39% of the samples although their mean bacterial counts (2.77 log<sub>10</sub> CFU/mL; 95% CI: 2.71–2.83) were lower when compared to *S. epidermidis* and *S. aureus* counts. The detection frequency of *Rothia* spp. was 1.04% (Table 1).

The total bacterial counts of streptococci in the milk samples included in the study oscillated between 1.70 and 6.18 log<sub>10</sub> CFU/mL and had a mean value of 3.51 log<sub>10</sub> CFU/mL (95% CI: 3.46–3.56) (Table 1). This group was isolated from 70.20% of the samples and, therefore, constitutes the second most prevalent bacterial group in milk from mastitis cases. Streptococcal isolates belonging to the Mitis and Salivarius groups were detected in 50.68% and 32.23% of the samples, respectively. Streptococci isolated from 9.95% of the samples could not be assigned to any of these two streptococcal groups (Table 1).

*Corynebacterium* spp. was the third bacterial group most frequently found (16.60 %) in mastitis specimens, with counts ranging from 1.70 to 5.70 log<sub>10</sub> CFU/mL, and a mean value of 2.86 log<sub>10</sub> CFU/mL (95% CI: 2.77–2.94) (Table 1). Other bacterial groups such as enterococci and enterobacteria were also isolated although they were less frequently found (2.21 and 4.06%, respectively) and their mean bacterial counts were lower (Table 1). Up to 211 breast milk samples (11.41%) contained isolates that could not be identified with the culture media and procedures routinely employed in this work.

*Candida* spp. were isolated from 0.54% of the milk samples analyzed in this study and, in the very low number of samples where they were present, the mean yeast count was 2.36 log<sub>10</sub> CFU/mL (95% CI: 1.90–2.82) (Table 1).

#### **III.4.2. Identification of isolates from lactational mastitis based on the sequencing of 16S rRNA gene**

A total of 211 isolates were further identified by 16S rRNA PCR sequencing. For this purpose, single amplicons of the expected size (~500 bp) were obtained and sequenced (Table 2).

Among the 62 isolates belonging to the CNS and related bacteria group, 5 genera were identified (*Staphylococcus*, *Rothia*, *Kocuria*, *Kytococcus* and *Micrococcus*) and all isolates could be identified at the species level being classified in a total of 12 different species (Table 2). Besides *S. epidermidis* (17 isolates), four different CNS species were identified from these mastitis samples: *Staphylococcus hominis* (4), *Staphylococcus lugdunensis* (3), *Staphylococcus pasteurii* (8), and *Staphylococcus warneri* (5). *Rothia mucilaginosa* (12) and *Kocuria kristinae* (6) were the *Streptococcus*-related species most commonly isolated.

Ten different *Streptococcus* species belonging to VGS were identified by 16S rRNA gene sequencing from a total of 102 VGS isolates (Table 2). Most of them (82) could be identified at the species level, but 15 isolates were included in the Mitis group without precise species-level identification since the same isolate showed ≥ 98% gene homology with two different species. Five isolates could be identified only at the genus

level. Most of the streptococcal species belonged to the Mitis (*Streptococcus mitis*, 18 isolates; *Streptococcus parasanguinis*, 20 isolates) or the Salivarius (*Streptococcus salivarius*, 23 isolates; *Streptococcus vestibularis*, 6 isolates) groups. Only 1 isolate was clearly identified as *Streptococcus pneumoniae*, while for 8 isolates it was not possible to differentiate between *St. pneumoniae* and its closest relative *St. mitis* (Table 2).

A total of 37 (out of 47) coryneform isolates could be identified by 16S rRNA at the species-level and they were included in 14 different species. The species with more isolates were *Corynebacterium amycolatum* (6), *Corynebacterium kroppenstedtii* (5), *Corynebacterium tuberculostrictum* (8) and *Actinomyces odontolyticus* (4). A conclusive species level-identification could not be attained for ten isolates of *Corynebacterium* spp. (9 isolates) and *Actinomyces* spp. (1 isolate) (Table 2).

### III.4.3. Bacterial diversity in milk samples from women with mastitis

Among the 1,849 milk samples analyzed in this study, the minimum number of different culturable species per sample ranged from 1 to 7, although most of the samples (~80%) displayed between 2 and 4 (30% of the samples had 2 different species, 32% had 3, and 18% had 4). The hierarchical clustering considering the bacterial counts of main taxonomic groups identified in all the samples is shown in Fig. 1. The samples were separated into two main clusters. The main cluster contained 60% of the samples and included, among others, well-defined groups such as the most numerous holding exclusively *S. epidermidis* in its main branch; the minor branch of this cluster mostly comprised samples containing *S. aureus* isolates, either exclusively or in combination either with *S. epidermidis* or with *S. epidermidis* and *St. salivarius* isolates (Fig. 1). The second cluster grouped contained 40% of the samples and was composed of samples displaying the second most frequent bacterial combination, i.e. *S. epidermidis* and Mitis group streptococci, either alone or in combination with isolates from other bacterial groups; a small, but well defined, group of samples characterized by the presence of Mitis group streptococci solely could be distinguished in this cluster. Globally, a wide variety of bacterial combinations was observed (Fig. 1).

A more detailed examination of the bacterial composition observed on samples (n = 1,373) that contained the most frequent bacterial profiles is shown in Fig. 2. The most



common samples were those containing exclusively isolates from the bacterial species *S. epidermidis* (n = 199; 10.76% of the samples) (Fig. 2). In contrast, only 22 (1.19%) samples were composed purely of *S. aureus*, and approximately the same frequency was registered for samples containing only isolates of the Mitis group streptococci (n = 19, 1.03%). The combinations of *S. epidermidis* with either Mitis group streptococci or *S. aureus* isolates were the second and third most common patterns (9.79 and 6.76% of total samples, respectively) (Fig. 2). In fact, when the co-occurrence pattern of main bacterial groups (found in >10% of samples) was explored, *S. epidermidis* was the bacterial species that was most frequently associated with all other bacterial groups, except with non-Mitis or non-Salivarius group streptococci (co-occurrence index: 0.27 in a range [0-1]; Fig. 3). The highest co-occurrence index corresponded to the pair *S. epidermidis*-Mitis group streptococci (0.64) (Fig. 3). Significantly, *S. aureus* and *Corynebacterium* spp. displayed a co-exclusion relationship that was also observed between *S. aureus* and other bacterial groups such as *Rothia* spp., non-Mitis or non-Salivarius group streptococci or other isolates that could not be identified (Fig. 3). In fact, the percentage of samples where *Rothia* spp. and *Corynebacterium* spp. were found increased from 16.00 and 3.89% in *S. aureus*-positive samples to 33.64 and 12.71%, respectively, in *S. aureus*-negative ones ( $\chi^2$  test,  $P = 0.000$ ). Globally, the level of association between the different pairs of bacterial groups was low since most of the co-occurrence indexes were below 0.5 in the 0-1 range (Fig. 3).

### III. 5. DISCUSSION

The number of studies dealing with the etiology of human infectious mastitis is still limited and the role of specific agents has not been elucidated yet. In fact, the growing interest concerning the bacterial diversity in human milk of healthy women (Fernández *et al.*, 2013; Jeurink *et al.*, 2013; Jost *et al.*, 2013; Jost *et al.*, 2015), as well as the relevance of an accurate etiologic diagnosis in bovine mastitis due to its economic impact (Zadoks *et al.*, 2011; Ajitkumar *et al.*, 2012; Gurjar *et al.*, 2012; Oikonomou *et al.*, 2012; Oikonomou *et al.*, 2014), clearly contrast with the limited research about the pathogens involved in human mastitis.

Milk cultures are not routinely performed to identify the etiological agent(s) of mastitis and its(their) antibiotic sensitivity (WHO, 2000; Amir and Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee, 2014). In fact, there is some controversy in the literature regarding the value of milk bacterial cultures in case of lactational mastitis. Some authors have suggested that the results may be difficult to interpret since the same bacterial species may be found in healthy and affected woman (Kvist *et al.*, 2008). However, Eglash and Proctor (2007) pointed out the need to develop reliably culture protocols in case of chronic breast pain, and to correlate exam findings with culture results and therapy outcomes. Recently, Witt *et al.* (2014) indicated that milk cultures help identify potential pathogens and provide targeted antibiotic treatment, thus reducing length of antibiotic use. Betzold (2012) has published a systematic review about microbial testing in lactating women with deep breast pain and emphasized that milk cultures should be done. The author pointed out some limitations during analysis such as different sampling and culturing procedures, no report of rates of microbial growth or species found in the samples and lack of information about antifungal/antibiotic treatment previous to sampling. Globally, there is a lack of standardized protocols for sample collection, storage and analysis in the scarce studies that reported microbiological data of milk cultures, and many of them did not considered the potential role of CNS o VGS as possible mastitis agents (Eglash *et al.*, 2006; Eglash and Proctor, 2007; Witt *et al.*, 2014).

Staphylococci are the most common pathogens causing human mastitis (Barbosa-Cesnik *et al.*, 2003; Lawrence and Lawrence, 2011), being *S. aureus* traditionally

considered the main etiological agent of acute mastitis and breast abscesses (Reddy *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2011; Branch-Elliman *et al.*, 2012) and CNS, in particular *S. epidermidis*, usually related to subacute or subclinical infection. CNS have been significantly underrated as mastitis-causing agents due to their subtle clinical presentation, the lack of routine microbiological analyses of milk and the fact that they are usually regarded as skin-associated commensal bacteria. However CNS are emerging nowadays as the leading cause of mastitis in quantitative terms in both human and veterinary medicine (Delgado *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009b; Contreras and Rodríguez, 2011; Fernández *et al.*, 2014). This microorganism is a commensal inhabitant of human skin and mucosal surfaces in healthy hosts but it has developed strategies to success as a relevant pathogen (Schoenfelder *et al.*, 2010; Otto, 2014). Its increasing incidence as a cause of nosocomial infections has already been recognized, concurrent with the extensive use of indwelling devices such as catheters in medical practice (Casey *et al.*, 2007; Piette and Verschraegen, 2009). In fact, its ability to produce biofilms seemed to be a key pathogenic mechanism related to prosthetic device infections and it could also be related to its potential role in infectious mastitis along with the multiresistance to antibiotics, as in the case of *S. aureus* (Reddy *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2009b; Delgado *et al.*, 2011).

The results of this work suggest that *S. epidermidis* has to be taken in account as a relevant etiologic agent in human mastitis, which is in agreement with the findings of previous studies (Delgado *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009b). In contrast, other studies have dismissed the role of CNS in mastitis and chronic breast pain since no difference was found in CNS counts between mastitis cases and controls or even lower CNS counts were reported in women with breast pain compared to controls (Kvist *et al.*, 2008; Witt *et al.*, 2014). However, accurate identification of CNS isolates at the species level is necessary to provide a better understanding of its potential pathogenicity. In fact, many clinical and epidemiological data concerning these organisms usually refer to the entire CNS group, rather than to a single species, which might be an obstacle in research and diagnostics (Savini *et al.*, 2009; Podkowik *et al.*, 2013). It must be highlighted that CNS, and particularly strains of *S. epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*, isolated from the milk of human mastitis cases have been shown to

produce mastitis in a mice model, supporting their role as possible etiologic agent of human mastitis (Thomsen *et al.*, 1985).

In addition to *S. epidermidis*, other CNS species have been isolated from mastitis samples in this work (*S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. pasteurii*, and *S. warnerii*), in agreement with previous studies about lactational mastitis (Delgado *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009b). *S. lugdunensis* seems to be more pathogenic than other CNS species (Piette and Verschraegen, 2009; Podkowik *et al.*, 2013) and it has been associated with skin and soft tissue infections and also with cases of non-lactational breast abscesses (Sánchez *et al.*, 2001; Asnis *et al.*, 2003). The role of *S. pasteurii* in human diseases remains unclear to date but its capacity to develop multidrug resistance mechanisms is becoming an important clinical and microbiological concern (Savini *et al.*, 2009). Similarly, *S. warnerii* and *S. hominis* have a tendency to develop antibiotic resistance and can cause catheter-related bacteremia because of the biofilm-forming potential of some isolates (Campoccia *et al.*, 2010; Arslan *et al.*, 2011; Mendoza-Olazarán *et al.*, 2013; Szczuka *et al.*, 2014).

The family *Micrococcaceae* comprises some genera (*Rothia* and *Kocuria*) closely related to *Staphylococcus*. Some species from such genera are difficult to discriminate from staphylococci and, therefore, can be misidentified as mastitis-causing agents. In fact, such microorganisms have received marginal attention to date regarding its potential role in mastitis even though they have been previously isolated from mastitis samples (Delgado *et al.*, 2008; Arroyo *et al.*, 2010). They are part of the microbiota of the oral cavity and respiratory tract in humans and are increasingly recognized as an emerging opportunistic pathogen in immunocompromised patients (Savini *et al.*, 2010; Bruminhent *et al.*, 2013; Purty *et al.*, 2013). *R. mucilaginosa* and *K. kristinae*, the most common species of these genera isolated in this study, have been previously involved in catheter-associated bacteremia, which could be related, as in the case of CNS, to increased antibiotic resistance in biofilm-associated infections (Dunn *et al.*, 2011; Lai *et al.*, 2011; Ramanan *et al.*, 2014).

Streptococci are the second bacterial group involved in human infectious mastitis, normally related to subacute and subclinical processes (WHO, 2000; Contreras and Rodríguez, 2011), in consonance with the results of this study. However, studies

reporting their isolation from milk samples of women suffering from this condition are scarce (Delgado *et al.*, 2008, Arroyo *et al.*, 2010), probably because they are frequently considered contaminants due its ubiquitous prevalence as commensal species and because of the difficulties for a proper taxonomical identification among different streptococcal species. *Streptococcus agalactiae* is a leading cause of bovine mastitis and it is also the most important cause of neonatal bacterial sepsis, but it has not been associated to human mastitis (Keefe, 1997; Delgado *et al.*, 2009a; Contreras and Rodríguez, 2011). Streptococci involved in human mastitis mainly belong to the VGS, a heterogeneous group of microorganisms that includes both commensal and pathogenic strains (Doern and Burnham, 2010). VGS is subdivided into four major phylogenetic groups (anginosus, mitis, mutans and salivarius) on the basis of 16S rRNA gene analysis (Facklam, 2002).

The correct identification of VGS at the species level is becoming an important issue to provide a better understanding of their epidemiology, pathogenicity and the increasing antibiotic resistance observed among them (Bruckner and Gigliotti, 2006; Doern and Burnham, 2010). Despite the spectacular advances in bacterial identification methods over the last decades, it remains extremely difficult to make an accurate identification of some species, in particular among those of the Mitis group (Doern and Burnham, 2010; Facklam, 2002). The traditional identification of streptococcal isolates based on phenotypic characterization is not reliable due to the lack of species-specific biochemical traits and the absence of updated databases incorporating their constant taxonomical rearrangements (Hoshino *et al.*, 2005; Ikryannikova *et al.*, 2011; Teles *et al.*, 2011). In addition, new VGS species, such as *Streptococcus lactarius* (Martín *et al.*, 2011), have been discovered in the last decade and it is highly probable that many novel species remains unidentified at present. Sequence analysis of the 16S rRNA gene has been widely accepted for bacterial identification and extensively applied for streptococci, although its ability to differentiate closely related streptococcal species has been questioned. In fact, the 16S rRNA gene sequence of some members of the mitis group such as *S. mitis*, *Streptococcus oralis* and *S. pneumoniae* share a very high percentage of identity and complicates the discrimination among them by this molecular technique (Kawamura *et al.*, 1995). *S. pneumoniae* is an extremely rare cause of mastitis and only three cases of pneumococcal mastitis have been reported in the medical

literature (Miedzybrodzki and Miller, 2013). It has to be taken into account that it is possible that in the past many *S. mitis* isolates were misidentified as *S. pneumoniae*, a well recognized pathogen. Differentiation between *S. mitis* and *S. oralis* remains also a challenge and it could not be reached in some of the isolates tested in this study.

We are aware that the use of 16S rRNA gene alone is insufficient to discriminate among some of the species of this study; nevertheless, it has been a starting point for characterization of VGS that will be further complemented in future studies by using different techniques. Alternative identification procedures, either based on other conserved housekeeping genes, such as *recA*, *sodA* or *tuf* (Teles *et al.*, 2011; Zbinden *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012) or in the application of the matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Friedrichs *et al.*, 2007; Branda *et al.*, 2013), have been proposed in order to improve the discrimination among streptococcal species.

Many coryneform bacteria constitute a part of the normal microbiota of skin and mucous membranes and it may be difficult to correctly decide if their recovery in clinical samples implies contamination or has clinical relevance. However, they are increasingly recognized as the cause of human infections (Bernard, 2012), and many medically relevant species have been shown broad-spectrum antibiotic resistance which can have important therapeutic implications (Ortiz-Perez *et al.*, 2010). In relation to mastitis, corynebacteria are common mastitis agents in ruminants (Contreras and Rodríguez, 2011) and they have been involved in human granulomatous mastitis, a chronic inflammatory disease previously considered of unknown etiology that often mimics malignancy (Paviour *et al.*, 2002; Taylor *et al.* 2003; Mathelin *et al.*, 2005). The pathogenesis of granulomatous mastitis is unknown but it has been suggested that there is a progression from subclinical mastitis to mastitis and, finally, to breast abscess with granuloma formation (Riegel *et al.*, 2004). Consequently, corynebacteria are often found in histological specimens from deep breast tissue surrounded by a granulomatous inflammatory reaction, and when isolated from clinical samples, are usually fastidious organisms that require specific culture media and may need more than 72 h to appear in culture (Mathelin *et al.*, 2005; Stary *et al.*, 2011). These facts may be responsible for the underdiagnosis of human mastitis caused by corynebacteria in the past. In this study,

14 different species were identified and those most frequently isolated (*C. kroppenstedtii*, *C. amycolatum*, and *C. tuberculostrictum*) have been formerly involved in human granulomatous mastitis (Paviour *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2003; Bercot *et al.*, 2009).

The taxonomical changes that coryneform bacteria have undergone during the last decades make their identification problematic; however, their relevance as human pathogens has become noticeable and their identification at species level should be always performed (Funke *et al.*, 1997). Due to the great variety of metabolic processes on a species-specific basis, the phenotypic identification often fails to accurately classify coryneform bacteria, but the DNA-based methods have greatly contributed to a more precise characterization of many species, being 16S rRNA and *rpoB* gene sequencing the most widely used approaches (Bernard, 2012). In recent years, the application of MALDI-TOF MS has emerged as a reliable tool for the identification of *Corynebacterium* and *Actinomyces* species from clinical samples (De Vreese and Verhaegen, 2013; Barberis *et al.*, 2014; Verroken *et al.*, 2014).

*Propionibacterium acnes*, a species also isolated in this study, was found, together with corynebacteria, in a case of granulomatous mastitis (Paviour *et al.*, 2002), and has been also reported in mastitis samples (Kvist *et al.*, 2008). *Actinomyces* spp. have also been involved in human infections (Valour *et al.*, 2014) and described as common mastitis pathogens in ruminants (Contreras and Rodríguez, 2011); however, no data are available about its previous isolation in human mastitis samples. In this study, 6 isolates of this genus were recovered, 4 of them belonging to *A. odontolyticus*. This genus has the ability to associate with other bacteria, such as streptococci, and develop biofilm (Palmer *et al.*, 2003), which is an interesting aspect to consider in relation to its potential involvement in mastitis.

The isolation of *Candida* spp. from the milk samples in this study was very scarce (0.5% of the samples). Actually, yeasts are an extremely rare cause of lactational mastitis in any mammalian species and human mastitis cases have been frequently misdiagnosed as mammary candidiasis just on the basis of a visual evaluation of the breast, without effective isolation of the pathogen in the samples (Carmichael and Dixon, 2002; Hale *et al.*, 2009). It is interesting to address the association between

staphylococcal/streptococcal mastitis and candidiasis in the infant (oral thrush) since such bacteria can induce *Candida albicans* overgrowth. In fact, *C. albicans* and staphylococci/streptococci form a synergistic partnership where bacteria promote fungal growth and coaggregate leading to mixed-species biofilms (Harriott and Noverr, 2009; Shirtliff *et al.*, 2009; Morales and Hogan, 2010; Beaussart *et al.*, 2013). After *C. albicans* overgrowth in the infant mouth, some of the yeast cells can be transferred to mother through breastfeeding, so that *C. albicans* could be isolated from breast milk and misdiagnosed as the cause of mastitis. Recently, Amir *et al.* (2013) have shown a potential link between *Candida* and nipple/breast pain. However, in this study *Candida* spp. was infrequently isolated using standard microbiological culture techniques and the probable role of other microorganisms involved in breast pain, such as CNS or VGS, was not taken into account. In a different study, *C. albicans* was found more often in breastfeeding mothers who report pain compared with asymptomatic ones, but this microorganism could not be isolated from breast milk/nipple cultures of the majority (70%) of patients with pain (Andrews *et al.*, 2007).

Enterococci and Gram-negative bacteria, such as enterobacteria or *Pseudomonas*, are not usually etiological agents in human mastitis and, therefore, their high concentration found in this study in some samples could be related to the use of breast pumps for sample collection, although the women participating in the study were advised against this practice. In this sense, it is necessary to be aware of the potential transmission of a wide spectrum of microorganisms through these devices if they are not submitted to a proper sterilization (Marín *et al.*, 2009).

The human milk microbial community has proven to be complex (Hunt *et al.*, 2011; Jeurink *et al.*, 2013; Jost *et al.*, 2013; Jost *et al.*, 2015), and diverse relationships, either antagonistic, cooperative or neutral, affect the equilibrium of this bacterial consortium and may support health or promote disease as it has been described in other ecological niches (Faust *et al.*, 2012). Our findings support the role of *S. epidermidis* as an opportunistic pathogen, as its co-occurrence with other bacterial groups, such as streptococci (especially isolates belonging to the Mitis and Salivarius groups) or *Rothia* spp., is frequent. Other bacterial groups such as *S. aureus* or *Corynebacterium* spp., on the contrary, seem to establish a strong negative exclusion



relationship with other members of the milk microbiota. Recently, a non-cooperative relationship between *Corynebacterium* and *Staphylococcus* and other bacterial genera has been suggested after studying bacterial interactions within the milk microbiome using metagenomic pyrosequencing data of the 16S rRNA gene from human milk samples (Hunt *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2015).

### **III.6. CONCLUSION**

This study shows that a proper diagnosis of mastitis should be established after performing a microbiological analysis of milk based on standardized sampling procedures, taking into account that many CNS, VGS and corynebacteria species, usually considered commensal microorganisms and dismissed as mere contaminant bacteria, may play an important role as potential pathogens involved in this condition. Furthermore, it is important to address that a reliable analysis must identify the causing-organism(s) at species level. Ongoing work is focused on the application of molecular techniques and MALDI-TOF MS for a precise identification of microorganisms isolated in human milk, including CNS, VGS and corynebacteria, as well as to study their virulence factors and resistance to antibiotics. In addition, more studies comparing the quantitative and qualitative composition of the human milk microbiota in healthy and mastitis-suffering women are required.

### III.7. REFERENCES

- Ajitkumar P, Barkema HW, De Buck J: Rapid identification of bovine mastitis pathogens by high-resolution melt analysis of 16S rDNA sequences. *Vet Microbiol* 2012, 155:332–340.
- Amir LH, Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee: ABM Clinical Protocol #4: Mastitis, revised march 2014. *Breastfeed Med* 2014, 9:239–243.
- Amir LH, Donath SM, Garland SM, Tabrizi SN, Bennett CM, Cullinane M, Payne MS: Does *Candida* and/or *Staphylococcus* play a role in nipple and breast pain in lactation? A cohort study in Melbourne, Australia. *BMJ Open* 2013, 3.
- Amir LH, Forster DA, Lumley J, McLachlan H: A descriptive study of mastitis in Australian breastfeeding women: incidence and determinants. *BMC Public Health* 2007, 7:62.
- Amir LH, Garland SM, Lumley J: A case-control study of mastitis: nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *BMC Fam Pract* 2006, 7:57.
- Andrews JI, Fleener DK, Messer SA, Hansen WF, Pfaller MA, Diekema DJ: The yeast connection: is *Candida* linked to breastfeeding associated pain? *Am J Obstet Gynecol* 2007, 197:424.e1–424.e4.
- Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM: Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 2010, 50:1551–1558.
- Arroyo R, Mediano P, Martín V, Jiménez E, Delgado S, Fernández L, *et al.*: Etiological diagnosis of infectious mastitis: proposal of a protocol for the culture of human milk samples. *Acta Pediatr Esp* 2011, 69:276–281.
- Arslan F, Saltoglu N, Mete B, Mert A: Recurrent *Staphylococcus warnerii* prosthetic valve endocarditis: a case report and review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2011, 10:14.
- Asnis DS, John SS, Tickoo R, Arora A: *Staphylococcus lugdunensis* breast abscess: is it real? *Clin Infect Dis* 2003, 36:1348–1348.
- Barberis C, Almuzara M, Join-Lambert O, Ramírez MS, Famiglietti A, Vay C: Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of gram-positive rods. *PLoS One* 2014, 9:e106303.
- Barbosa-Cesnik C, Schwartz K, Foxman B: Lactation mastitis. *JAMA* 2003, 289:1609–1612.
- Beaussart A, Herman P, El-Kirat-Chatel S, Lipke PN, Kucharíková S, Van Dijck P, Dufrêne YF: Single-cell force spectroscopy of the medically important *Staphylococcus epidermidis*-*Candida albicans* interaction. *Nanoscale* 2013, 5:10894–10900.
- Begović J, Jovčić B, Papić-Obradović M, Veljović K, Lukić J, *et al.*: Genotypic diversity and virulent factors of *Staphylococcus epidermidis* isolated from human breast milk. *Microbiol Res* 2013, 168:77–83.

- Bercot B, Kannengiesser C, Oudin C, Grandchamp B, Pors M-JS, Mouly S, *et al.*: First description of NOD2 variant associated with defective neutrophil responses in a woman with granulomatous mastitis related to corynebacteria. *J Clin Microbiol* 2009, 47:3034–3037.
- Bernard K: The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J Clin Microbiol* 2012, 50:3152–3158.
- Betzold CM: Results of microbial testing exploring the etiology of deep breast pain during lactation: a systematic review and meta-analysis of nonrandomized trials. *J Midwifery Womens Health* 2012, 57:353–364.
- Branch-Elliman W, Golen TH, Gold HS, Yassa DS, Baldini LM, Wright SB: Risk factors for *Staphylococcus aureus* postpartum breast abscess. *Clin Infect Dis* 2012, 54:71–77.
- Branda JA, Markham RP, Garner CD, Rychert JA, Ferraro MJ: Performance of the Vitek MS v2.0 System in distinguishing *Streptococcus pneumoniae* from nonpneumococcal species of the *Streptococcus mitis* group. *J Clin Microbiol* 2013, 51:3079–3082.
- Bruckner L, Gigliotti F: Viridans group streptococcal infections among children with cancer and the importance of emerging antibiotic resistance. *Semin Pediatr Infect Dis* 2006, 17:153–160.
- Bruminhent J, Tokarczyk MJ, Jungkind D, DeSimone JA: *Rothia mucilaginosa* prosthetic device infections: a case of prosthetic valve endocarditis. *J Clin Microbiol* 2013, 51:1629–1632.
- Campoccia D, Montanaro L, Visai L, Corazzari T, Poggio C, Pegreff F, *et al.*: Characterization of 26 *Staphylococcus warneri* isolates from orthopedic infections. *Int J Artif Organs* 2010, 33:575–581.
- Carmichael AR, Dixon JM: Is lactation mastitis and shooting breast pain experienced by women during lactation caused by *Candida albicans*? *Breast* 2002, 11:88–90.
- Casey AL, Lambert PA, Elliott TSJ: Staphylococci. *Int J Antimicrob Agents* 2007, 29 Suppl 3:S23–32.
- Contreras GA, Rodríguez JM: Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011, 16:339–356.
- Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez J: Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (I). *Acta Pediatr Esp* 2009a, 67:77–84.
- Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Marín ML, del Campo R, Fernández L, *et al.*: *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiol* 2009b, 9:82.
- Delgado S, Arroyo R, Martín R, Rodríguez JM: PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infect Dis* 2008, 8:51.

- Delgado S, García P, Fernández L, Jiménez E, Rodríguez-Baños M, del Campo R, *et al.*: Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011, 62:225–235.
- De Vreese K, Verhaegen J: Identification of coryneform *Actinomyces neuui* by MALDI-TOF MS: 5 case reports and review of literature. *Acta Clin Belg* 2013, 68:210–214.
- Doern CD, Burnham C-AD: It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. *J Clin Microbiol* 2010, 48:3829–3835.
- Dunn R, Bares S, David MZ: Central venous catheter-related bacteremia caused by *Kocuria kristinae*: Case report and review of the literature. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2011, 10:31.
- Eglash A, Plane MB, Mundt M: History, physical and laboratory findings, and clinical outcomes of lactating women treated with antibiotics for chronic breast and/or nipple pain. *J Hum Lact* 2006, 22:429–433.
- Eglash A, Proctor R: Case report: a breastfeeding mother with chronic breast pain. *Breastfeed Med* 2007, 2:99–104.
- Facklam R: What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15:613–630.
- Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, Segata N, Gevers D, Raes J, *et al.*: Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput Biol* 2012, 8:e1002606.
- Fernández L, Arroyo R, Espinosa I, Marín M, Jiménez E, Rodríguez JM: Probiotics for human lactational mastitis. *Benef Microbes* 2014, 5:169–183.
- Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, *et al.*: The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 2013, 69:1–10.
- Foxman B, D'Arcy H, Gillespie B, Bobo JK, Schwartz K: Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. *Am J Epidemiol* 2002, 155:103–114.
- Friedrichs C, Rodloff AC, Chhatwal GS, Schellenberger W, Eschrich K: Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J Clin Microbiol* 2007, 45:2392–2397.
- Funke G, Graevenitz A von, Clarridge JE, Bernard KA: Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev* 1997, 10:125–159.
- Gurjar A, Gioia G, Schukken Y, Welcome F, Zadoks R, Moroni P: Molecular diagnostics applied to mastitis problems on dairy farms. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2012, 28:565–576.
- Hale TW, Bateman TL, Finkelman MA, Berens PD: The absence of *Candida albicans* in milk samples of women with clinical symptoms of ductal candidiasis. *Breastfeed Med* 2009, 4:57–61.

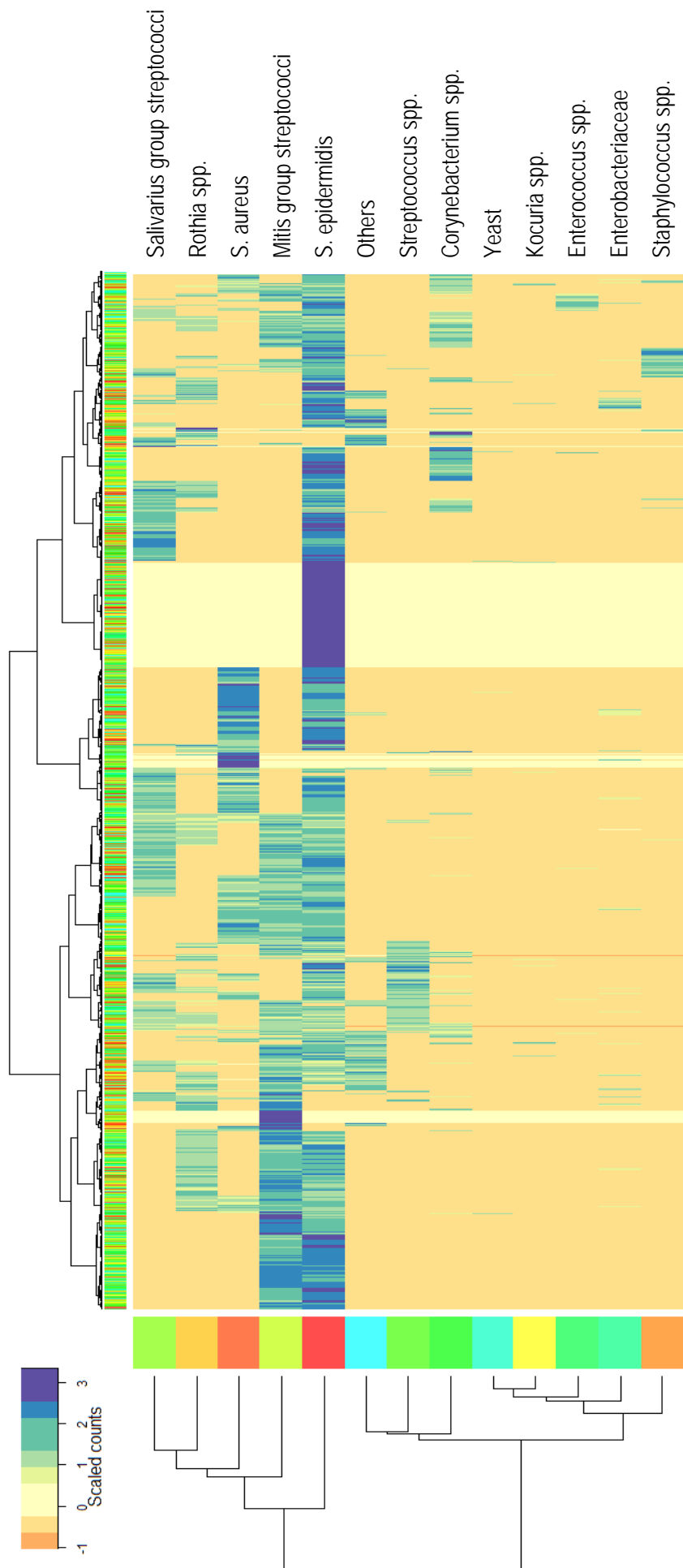
- Harriott MM, Noverr MC: *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2009, 53:3914–3922.
- Hoshino T, Fujiwara T, Kilian M: Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. *J Clin Microbiol* 2005, 43:6073–6085.
- Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UM, Beck DL, Abdo Z, *et al.*: Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One* 2011, 6:e21313.
- Ikryannikova LN, Lapin KN, Malakhova MV, Filimonova AV, Ilina EN, Dubovickaya VA, *et al.*: Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. *Infect Genet Evol* 2011, 11:1709–1715.
- Jeurink PV, van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, Knippels LMJ, Fernández L, Garssen J, *et al.*: Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes* 2013, 4:17–30.
- Jiménez E, Delgado S, Fernández L, García N, Albújar M, Gómez A, *et al.*: Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Res Microbiol* 2008, 159:595–601.
- Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C: Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br J Nutr* 2013, 110:1253–1262.
- Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C: Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr Rev* 2015, 73:426–437.
- Kawamura Y, Hou X-G, Sultana F, Miura H, Ezaki T: Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 1995, 45:406–408.
- Keefe GP: *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can Vet J* 1997, 38:429–437.
- Kinlay JR, O'Connell DL, Kinlay S: Risk factors for mastitis in breastfeeding women: results of a prospective cohort study. *Aust N Z J Public Health* 2001, 25:115–120.
- Kullen MJ, Sanozky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR: Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J Appl Microbiol* 2000, 89:511–516.
- Kvist LJ, Larsson BW, Hall-Lord ML, Steen A, Schalén C: The role of bacteria in lactational mastitis and some considerations of the use of antibiotic treatment. *Int Breastfeed J* 2008, 3:6.
- Lai CC, Wang JY, Lin SH, Tan CK, Wang CY, Liao CH, *et al.*: Catheter-related bacteraemia and infective endocarditis caused by *Kocuria* species. *Clin Microbiol Infect* 2011, 17:190–192.

- Lawrence RA, Lawrence RM: *Breastfeeding a Guide for the Medical Profession*. Maryland Heights, Mo.: Mosby/Elsevier; 2011.
- Li X, Xing J, Li B, Wang P, Liu J: Use of *tuf* as a target for sequence-based identification of Gram-positive cocci of the genus *Enterococcus*, *Streptococcus*, coagulase-negative *Staphylococcus*, and *Lactococcus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2012, 11:31.
- Ma Z (Sam), Guan Q, Ye C, Zhang C, Foster JA, Forney LJ: Network analysis suggests a potentially 'evil' alliance of opportunistic pathogens inhibited by a cooperative network in human milk bacterial communities. *Sci Rep* 2015, 5:8275.
- Marín ML, Arroyo R, Jiménez E, Gómez A, Fernández L, Rodríguez JM: Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009, 49:343–348.
- Martín V, Manes-Lazaro R, Rodriguez JM, Maldonado-Barragan A: *Streptococcus lactarius* sp. nov., isolated from breast milk of healthy women. *Int J Syst Evol Microbiol* 2011, 61:1048–1052.
- Mathelin C, Riegel P, Chenard M-P, Brettes J-P: Association of corynebacteria with granulomatous mastitis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005, 119:260–261.
- Mediano P, Fernández L, Rodríguez JM, Marín M: Case-control study of risk factors for infectious mastitis in Spanish breastfeeding women. *BMC Pregnancy Childbirth* 2014, 14:195.
- Mendoza-Olazarán S, Morfin-Otero R, Rodríguez-Noriega E, Llacá-Díaz J, Flores-Treviño S, González-González GM, *et al.*: Microbiological and molecular characterization of *Staphylococcus hominis* isolates from blood. *PLoS One* 2013, 8:e61161.
- Miedzybrodzki B, Miller M: A lactating woman presenting with puerperal pneumococcal mastitis: a case report. *J Med Case Rep* 2013, 7:114.
- Morales DK, Hogan DA: *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog* 2010, 6:e1000886.
- Oikonomou G, Bicalho ML, Meira E, Rossi RE, Foditsch C, Machado VS, *et al.*: Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *PLoS One* 2014, 9:e85904.
- Oikonomou G, Machado VS, Santisteban C, Schukken YH, Bicalho RC: Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16s rDNA. *PLoS One* 2012, 7:e47671.
- Ortiz-Pérez A, Martín-De-Hijas NZ, Esteban J, Fernández-Natal MI, García-Cía JJ, Fernández-Roblas R: High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. *Microb Drug Resist* 2010, 16:273–277.
- Osterman KL, Rahm V-A: Lactation mastitis: bacterial cultivation of breast milk, symptoms, treatment, and outcome. *J Hum Lact* 2000, 16:297–302.
- Otto M: *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis. *Methods Mol Biol* 2014, 1106:17–31.

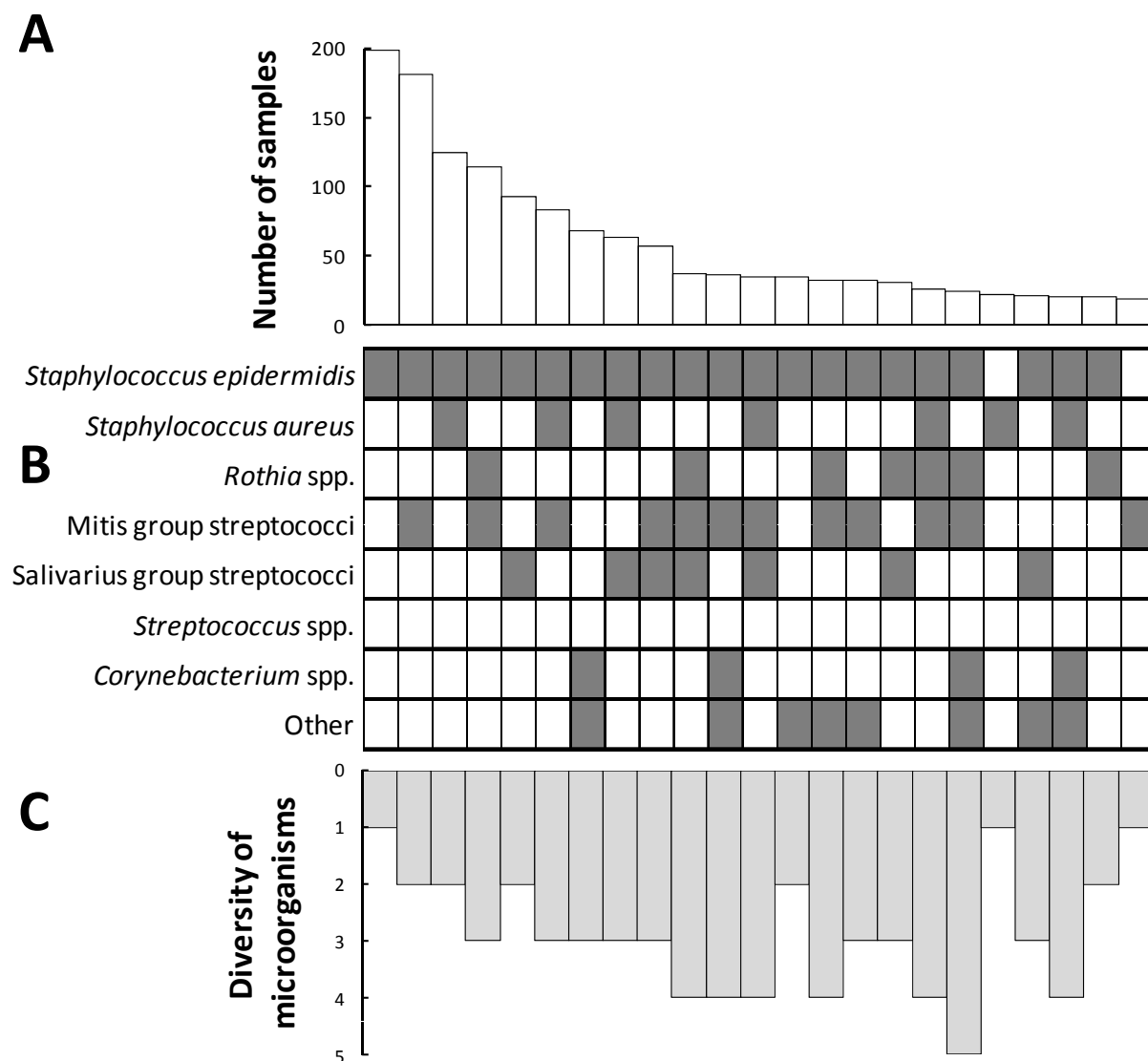
- Palmer RJ, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE: Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol* 2003, 185:3400–3409.
- Paviour S, Musaad S, Roberts S, Taylor G, Taylor S, Shore K, *et al.*: *Corynebacterium* species isolated from patients with mastitis. *Clin Infect Dis* 2002, 35:1434–1440.
- Piette A, Verschraegen G: Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol* 2009, 134:45–54.
- Podkowik M, Park JY, Seo KS, Bystroń J, Bania J: Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol* 2013, 163:34–40.
- Purty S, Saranathan R, Prashanth K, Narayanan K, Asir J, Sheela Devi C, *et al.*: The expanding spectrum of human infections caused by *Kocuria* species: a case report and literature review. *Emerg Microbes Infect* 2013, 2:e71.
- Ramanan P, Barreto JN, Osmon DR, Tosh PK: *Rothia* bacteremia: a 10-year experience at Mayo clinic, Rochester, Minnesota. *J Clin Microbiol* 2014, 52:3184–3189.
- Reddy P, Qi C, Zembower T, Noskin GA, Bolon M: Postpartum mastitis and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infect Dis* 2007, 13:298–301.
- Riegel P, Liégeois P, Chenard M-P, Mathelin C, Monteil H: Isolations of *Corynebacterium kroppenstedtii* from a breast abscess. *Int J Med Microbiol* 2004, 294:413–416.
- Sánchez P, Buezas V, Maestre JR: *Staphylococcus lugdunensis* infection: report of thirteen cases. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001, 19:475–478.
- Savini V, Catavittello C, Bianco A, Balbinot A, D'Antonio D: Epidemiology, pathogenicity and emerging resistances in *Staphylococcus pasteurii*: from mammals and lampreys, to man. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2009, 4:123–129.
- Savini V, Catavittello C, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Bianco A, *et al.*: Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. *J Med Microbiol* 2010, 59:1395–1402.
- Schoenfelder SMK, Lange C, Eckart M, Hennig S, Kozytska S, Ziebuhr W: Success through diversity - how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol* 2010, 300:380–386.
- Scott JA, Robertson M, Fitzpatrick J, Knight C, Mulholland S: Occurrence of lactational mastitis and medical management: A prospective cohort study in Glasgow. *Int Breastfeed J* 2008, 3:21.
- Shirliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA: Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2009, 299:1–8.
- Sary CM, Lee YS, Balfour J: Idiopathic granulomatous mastitis associated with *Corynebacterium* sp. infection. *Hawaii Med J* 2011, 70:99–101.
- Szczuka E, Telega K, Kaznowski A: Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiol (Praha)* 2014, 60:1–5.



- Taylor GB, Paviour SD, Musaad S, Jones WO, Holland DJ: A clinicopathological review of 34 cases of inflammatory breast disease showing an association between corynebacteria infection and granulomatous mastitis. *Pathology* 2003, 35:109–119.
- Teles C, Smith A, Ramage G, Lang S: Identification of clinically relevant viridans group streptococci by phenotypic and genotypic analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011, 30:243–250.
- Thomsen AC, Mogensen SC, Løve Jepsen F: Experimental mastitis in mice induced by coagulase-negative staphylococci isolated from cases of mastitis in nursing women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1985, 64:163–166.
- U.S. Department of Health and Human Services: The Surgeon General’s Call to Action to Support Breastfeeding. Washington, DC; 2011. Available at: <http://www.surgeongeneral.gov/library/calls/breastfeeding/index.html>. Accessed October 14, 2015.
- Valour F, Sénéchal A, Dupieux C, Karsenty J, Lustig S, Breton P, *et al.*: Actinomycosis: etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infect Drug Resist* 2014, 7:183–197.
- Witt A, Mason MJ, Burgess K, Flocke S, Zyzanski S: A case control study of bacterial species and colony count in milk of breastfeeding women with chronic pain. *Breastfeed Med* 2014, 9:29–34.
- World Health Organization (WHO): *Mastitis: Causes and Management*. Geneva, Switzerland: Dept. of Child and Adolescent Health and Development; 2000.
- Verroken A, Bauraing C, Deplano A, Bogaerts P, Huang D, Wauters G *et al.*: Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2014, 20:44–50.
- Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH: Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011, 16:357–372.
- Zbinden A, Köhler N, Bloemberg GV: *recA*-based PCR assay for accurate differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from other viridans streptococci. *J Clin Microbiol* 2011, 49:523–527.

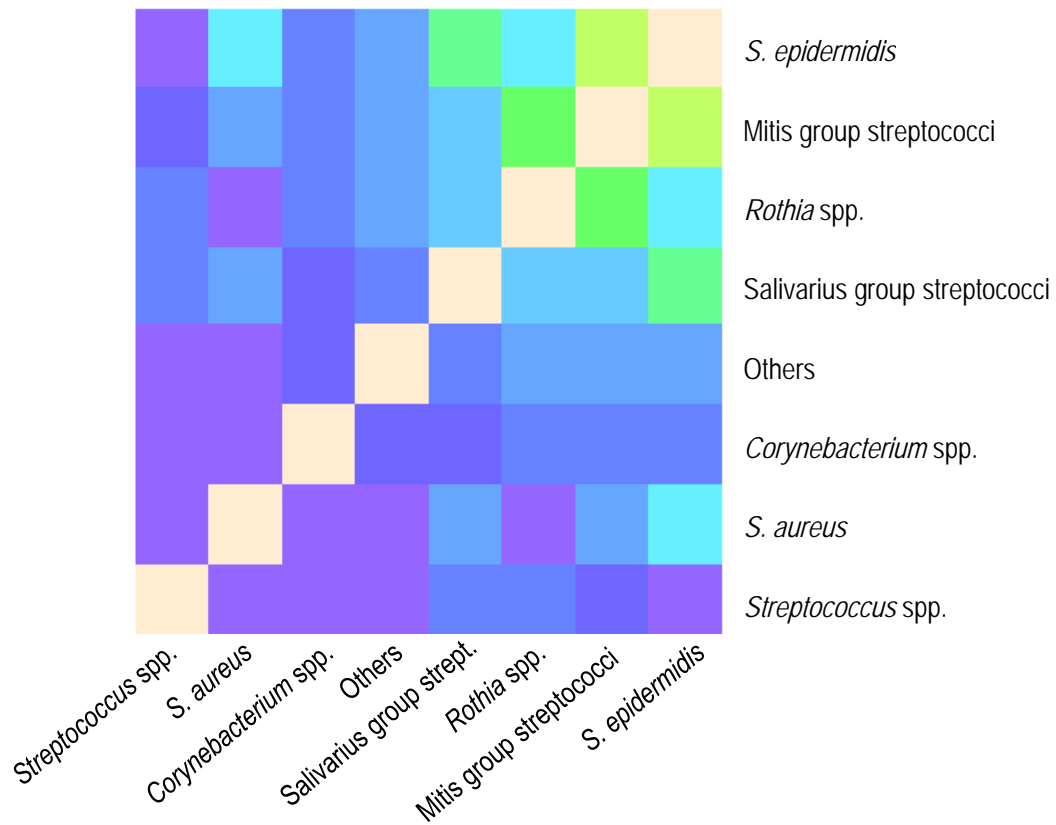


**FIGURE 1.** Heatmap illustrating the relative abundance of the predominant bacterial groups found in milk samples ( $N = 1,849$ ) from women suffering mastitis using culture techniques. Each column in the heatmap represents the main bacterial groups present in a single milk sample from a single individual. The dendrogram on the top of the figure represents the average linkage (UPGMA) hierarchical clustering of samples and the colored bar represents the vectorial global bacterial count of the sample considering the whole matrix data. The heatmap represents the bacterial count of the main bacterial groups detected in each milk sample after vectorization as indicated in the color legend at the top left. The dendrogram on the left side of the figure represents the hierarchical clustering of the main bacterial groups; the colored bar at the right of the dendrogram represents the abundance of the main bacterial groups.

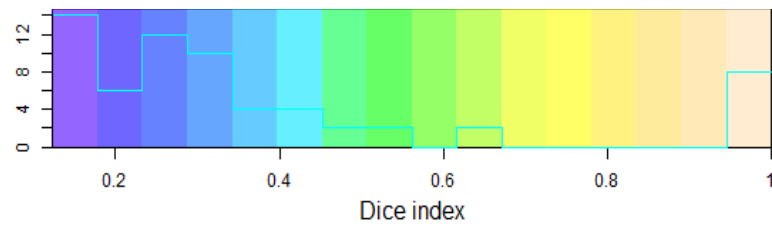


**FIGURE 2.** Bacterial diversity in milk samples from women suffering mastitis. The 23 most frequent different combinations of culturable bacteria in the tested milk samples are shown in the box grid (B) and each file represents an unique combination of bacterial species; white columns on top of each file indicate the number of milk samples in which each specific combination of bacteria was found (A) while the grey columns at the bottom of each file summarize the minimum number of different bacterial species identified in the sample (C).

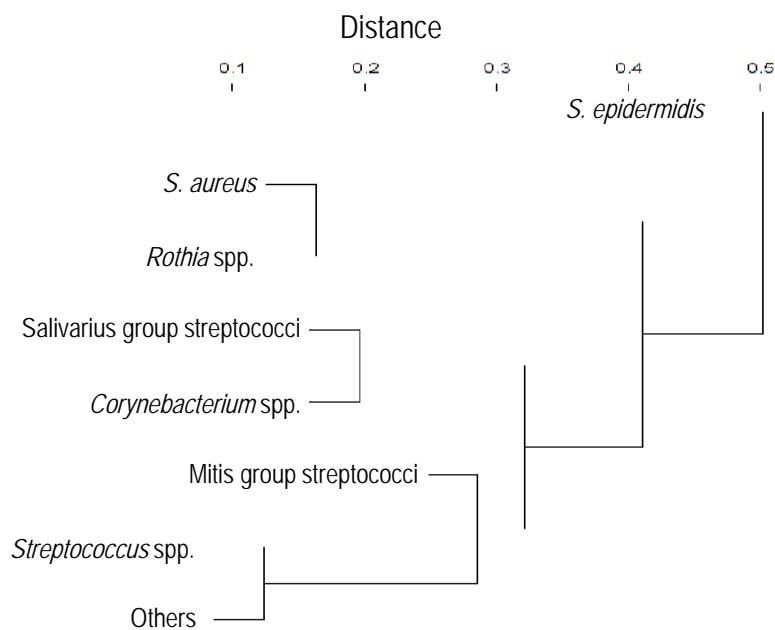
**A**



**B**



**C**



**FIGURE 3.** Analysis of co-occurrence among main bacterial groups found in milk samples from women suffering mastitis as scored using the Dice index (A). Only bacterial groups present in >15% of milk samples were included. The graph below represents the color legend of the figure and the frequency of the co-occurrence indexes (B). Relative distances between main bacterial groups after clustering on basis of Ward's criteria according to the co-occurrence indexes is shown at the bottom (C).

**TABLE 1.** Microbiological findings in milk samples of women suffering mastitis (N = 1,849)

<b>Microorganism</b>	<b>No. samples</b>	<b>Frequency (%)</b>	<b>Mean (95% CI) (log<sub>10</sub> CFU/ml)</b>	<b>Range [min, max] (log<sub>10</sub>)</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,693	91.56	3.64 (3.60 – 3.68)	4.78 [1.70, 6.48]
<i>Staphylococcus aureus</i>	550	29.74	3.53 (3.44 – 3.62)	4.20 [1.70, 5.90]
<i>Staphylococcus</i> spp.	72	3.89	3.46 (3.22 – 3.70)	3.70 [1.70, 5.40]
<i>Rothia</i> spp.	525	28.39	2.77 (2.71 – 2.83)	3.84 [1.70, 5.54]
<i>Kocuria</i> spp.	19	1.03	2.54 (2.11 – 2.97)	4.78 [1.70, 4.38]
Total staphylococci and related genera	1,804	97.57	3.79 (3.75 – 3.83)	4.78 [1.70, 6.48]
Mitis group streptococci	937	50.68	3.49 (3.44 – 3.55)	4.48 [1.70, 6.18]
Salivarius group	596	32.23	3.19 (3.13 – 3.25)	4.18 [1.70, 5.88]
<i>Streptococcus</i> spp.	184	9.95	3.39 (3.28 – 3.49)	3.78 [1.70, 5.48]
Total streptococci	1,298	70.20	3.51 (3.46 – 3.56)	4.48 [1.70, 6.18]
<i>Corynebacterium</i> spp.	307	16.60	2.86 (2.77 – 2.94)	4.00 [1.70, 5.70]
<i>Enterococcus</i> spp.	41	2.21	2.80 (2.55 – 3.05)	2.90 [1.70, 4.60]
<i>Enterobacteriaceae</i>	75	4.06	2.49 (2.37 – 2.61)	2.25 [1.70, 3.95]
<i>Candida</i> spp.	10	0.54	2.36 (1.90 – 2.82)	1.97 [1.70, 3.67]
Unidentified	211	11.41	3.08 (2.97 – 3.19)	4.00 [1.70, 5.70]
Total microorganisms	1,849	100.00	4.11 (4.08 – 4.15)	4.18 [2.30, 6.48]

CI, confidence interval

CFU, colony-forming units

**TABLE 2.** Identification by 16S rRNA gene sequencing of isolates belonging to coagulase-negative staphylococci, viridans group streptococci, corynebacteria and related species recovered from milk of women suffering from lactational mastitis

Bacterial species	No. isolates
<b>Coagulase-negative staphylococci and related species</b>	<b>62</b>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	17
<i>Staphylococcus hominis</i>	4
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	3
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	8
<i>Staphylococcus warneri</i>	5
<i>Rothia dentocariosa</i>	1
<i>Rothia mucilaginosa</i>	12
<i>Kocuria kristinae</i>	6
<i>Kocuria palustris</i>	1
<i>Kocuria rhizophila</i>	1
<i>Kytococcus schroeteri</i>	1
<i>Micrococcus luteus</i>	3
<b>Viridans group streptococci</b>	<b>102</b>
<i>Streptococcus australis</i>	1
<i>Streptococcus australis/infantis</i> <sup>a</sup>	2
<i>Streptococcus cristatus</i>	2
<i>Streptococcus infantis</i>	3
<i>Streptococcus mitis</i>	18
<i>Streptococcus mitis/oralis</i> <sup>a</sup>	5
<i>Streptococcus mitis/pneumoniae</i> <sup>a</sup>	8
<i>Streptococcus oralis</i>	4
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	20
<i>Streptococcus peroris</i>	4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
<i>Streptococcus salivarius</i>	23
<i>Streptococcus vestibularis</i>	6
<i>Streptococcus spp.</i> <sup>b</sup>	5

<sup>a</sup>Species level identification could not be reached for these isolates ( $\geq 98\%$  gene homology with two different species)

<sup>b</sup>Sequence similarity of these isolates was 95% to 97% (genus level)



**TABLE 2 (Continuation)** Identification by 16S rRNA gene sequencing of isolates belonging to coagulase-negative staphylococci, viridans group streptococci, corynebacteria and related species recovered from milk of women suffering from lactational mastitis

Bacterial species	No. isolates
<b>Corynebacteria and other coryneform bacteria</b>	<b>47</b>
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	6
<i>Corynebacterium argentoratense</i>	1
<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>	5
<i>Corynebacterium mucifaciens</i>	2
<i>Corynebacterium propinquum</i>	1
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>	1
<i>Corynebacterium simulans</i>	3
<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	8
<i>Corynebacterium</i> spp. <sup>b</sup>	9
<i>Actinomyces naeslundii</i>	1
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	4
<i>Actinomyces</i> spp. <sup>b</sup>	1
<i>Brevibacterium casei</i>	1
<i>Dietzia papillomatosis</i>	1
<i>Propionibacterium acnes</i>	2
<i>Propionibacterium avidum</i>	1

<sup>a</sup>Species level identification could not be reached for these isolates ( $\geq 98\%$  gene homology with two different species)

<sup>b</sup>Sequence similarity of these isolates was 95% to 97% (genus level)

*IV. Análisis de la diversidad de los  
estreptococos aislados de leche humana y  
comparación de diferentes métodos para su  
identificación taxonómica*

---

*IV. Streptococcal diversity of human milk and  
comparison of different methods for the  
taxonomic identification of streptococci*

Artículo publicado en  
*Journal of Human Lactation (2015)*



# Streptococcal Diversity of Human Milk and Comparison of Different Methods for the Taxonomic Identification of Streptococci

Journal of Human Lactation  
1-11

© The Author(s) 2015

Reprints and permissions:

sagepub.com/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/0890334415597901

jhl.sagepub.com



Virginia Martín, PhD<sup>1\*</sup>, Pilar Mediano<sup>1\*</sup>, Rosa del Campo, MD, PhD<sup>2</sup>,  
Juan M. Rodríguez, PhD<sup>1</sup>, and María Marín, PhD<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** The genus *Streptococcus* is 1 of the dominant bacterial groups in human milk, but the taxonomic identification of some species remains difficult.

**Objective:** The objective of this study was to investigate the discriminatory ability of different methods to identify streptococcal species in order to perform an assessment of the streptococcal diversity of human milk microbiota as accurately as possible.

**Methods:** The identification of 105 streptococcal strains from human milk was performed by 16S rRNA, *tuf*, and *sodA* gene sequencing, phylogenetic analysis, and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry.

**Results:** *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, and *Streptococcus parasanguinis* were the streptococcal dominant species in the human milk microbiota. Sequencing of housekeeping genes allowed the classification of 96.2% (16S rRNA), 84.8% (*sodA*), and 88.6% (*tuf*) of the isolates. Phylogenetic analysis showed 3 main streptococcal clusters corresponding with the *mitis* (73 isolates), *salivarius* (29), *mutans* (1)-*pyogenic* (2) groups, but many of the *mitis* group isolates (36) could not be assigned to any species. The application of the MALDI-TOF Bruker Biotyper system resulted in the identification of 56 isolates (53.33%) at the species level, but it could not discriminate between *S pneumoniae* and *S mitis* isolates, in contrast to the Vitek-MS system.

**Conclusion:** There was a good agreement among the different methods assessed in this study to identify those isolates of the *salivarius*, *mutans*, and *pyogenic* groups, whereas unambiguous discrimination could not be achieved concerning some species of the *mitis* group (*S mitis*, *S pneumoniae*, *S pseudopneumoniae*, *S oralis*).

## Keywords

bacterial identification methods, breastfeeding, human milk microbiota, *Streptococcus*

## Well Established

Recent studies have shown that human milk is a source of bacteria for the infant gut. The assessment of this bacterial diversity has revealed the frequent presence of streptococci, but the identification of some streptococcal species is still problematic.

## Newly Expressed

This is the first study focused on the assessment of the streptococcal diversity in human milk. We have investigated the discriminatory ability of several methods such as sequencing of housekeeping genes, phylogenetic analysis, and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight mass spectrometry. There was a good agreement among these approaches to identify those isolates of

the *salivarius*, *mutans*, and *pyogenic* groups, but the identification of some species of the *mitis* group still remains a challenge.

<sup>1</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain

\*The first 2 authors equally contributed to this work.

Date submitted: December 30, 2014; Date accepted: June 27, 2015.

## Corresponding Author:

María Marín, PhD, Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain.  
Email: mmarin@ucm.es

**Supplementary Table.** Results of the Sequence Analysis of 16S rRNA, *sodA* and *tuf* Genes and MALDI-TOF for the Identification of 105 *Streptococcus* Strains Isolated from Human Milk

Human Milk Isolates	16S rRNA (Sequence Similarity, %)	<i>sodA</i> (Sequence Similarity, %)	<i>tuf</i> (Sequence Similarity, %)	MALDI-TOF Bruker Biotyper (Score)	MALDI-TOF VITEK MS (Confidence Value)
<b>Mitis group</b>					
M537-01	<i>S. australis</i> (99)	<i>S. australis</i> (99)	<i>S. australis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (1.85)	-
M34-02	<i>S. cristatus</i> (99)	<i>S. mitis</i> (93)	<i>S. infantis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.82)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M42-08	<i>S. cristatus</i> (99)	<i>S. mitis</i> (92)	<i>S. pneumoniae</i> (98)	<i>S. pneumoniae</i> (2.09)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M34-06	<i>S. infantis</i> (99)	<i>S. peroris</i> (97)	<i>S. infantis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.62)	<i>S. mitis/oralis</i> (93.4)
M39-02	<i>S. infantis</i> (99)	<i>S. infantis</i> (99)	<i>S. infantis</i> (99)	No identification	-
M586-02	<i>S. infantis/australis</i> (99)	<i>S. infantis</i> (99)	<i>S. oralis</i> (98)	<i>S. peroris</i> (1.93)	-
M12-02	<i>S. lactarius</i> (98)	<i>S. parasanguinis</i> (98)	<i>S. lactarius</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.71)	<i>S. parasanguinis</i> (99.9)
M420b-01	<i>S. lactarius</i> (98)	<i>S. parasanguinis</i> (96)	<i>S. infantis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (1.68)	-
M559-01	<i>S. lactarius</i> (98)	<i>S. parasanguinis</i> (98)	<i>S. lactarius</i> (99)	<i>S. intermedius</i> (1.43)	-
M564-01	<i>S. lactarius</i> (98)	<i>S. parasanguinis</i> (93)	<i>S. lactarius</i> (98)	<i>S. parasanguinis</i> (1.63)	-
M19-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.87)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M1-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. oralis</i> (98)	<i>S. pneumoniae</i> (2.02)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M13-01	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (95)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. peroris</i> (2.01)	-
M22-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (100)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.93)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M23-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. pneumoniae/pseudopneumoniae</i> (98)	<i>S. pneumoniae</i> (1.92)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M28-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. oralis</i> (98)	<i>S. pneumoniae</i> (2.02)	<i>S. mitis/oralis</i> (98.9)
M28-03	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae/pseudopneumoniae</i> (98)	<i>S. pneumoniae</i> (2.08)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M30-04	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (97)	<i>S. pseudopneumoniae</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.15)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M27-02	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.77)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M37-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. pneumoniae</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.85)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)

**Supplementary Table.** Results of the Sequence Analysis of 16S rRNA, *sodA* and *tuf* Genes and MALDI-TOF for the Identification of 105 *Streptococcus* Strains Isolated from Human Milk

Human Milk Isolates	16S rRNA (Sequence Similarity, %)	<i>sodA</i> (Sequence Similarity, %)	<i>tuf</i> (Sequence Similarity, %)	MALDI-TOF Bruker Biotyper (Score)	MALDI-TOF VITEK MS (Confidence Value)
<b>Mitis group</b>					
M38-02	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.80)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M40-02	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. oralis</i> (1.73)	-
M42-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. australis</i> (98)	<i>S. oralis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (2.1)	-
M44-03	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. pneumoniae</i> (1.86)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M45-05	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. pseudopneumoniae</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (2.24)	-
M46-03	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pseudopneumoniae</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.98)	-
M498a-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (2.05)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M558-02	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.78)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M564-02	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (2.02)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M570-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. oralis</i> (1.71)	-
M573-01	<i>S. mitis</i> (96)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. pneumoniae</i> (2.10)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M574-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (95)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. pneumoniae</i> (1.44)	-
M575-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. pneumoniae/oralis/mitis</i> (1.90)	-
M575-02	<i>S. mitis</i> (100)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.91)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M579-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae/pseudopneumoniae</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (2.02)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M587-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.72)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M600-01	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.98)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
VS.15	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (100)	<i>S. pneumoniae</i> (2.15)	<i>S. mitis/oralis</i> (98.1)
VS.18	<i>S. mitis</i> (100)	<i>S. mitis</i> (100)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.92)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)

**Supplementary Table.** Results of the Sequence Analysis of 16S rRNA, *sodA* and *tuf* Genes and MALDI-TOF for the Identification of 105 *Streptococcus* Strains Isolated from Human Milk

Human Milk Isolates	16S rRNA (Sequence Similarity, %)	<i>sodA</i> (Sequence Similarity, %)	<i>tuf</i> (Sequence Similarity, %)	MALDI-TOF Bruker Biotyper (Score)	MALDI-TOF VITEK MS (Confidence Value)
<b>Mitis group</b>					
VS-19	<i>S. mitis</i> (100)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (2.12)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
VS-21	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.95)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
VS-22	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (92)	<i>S. pneumoniae</i> (2.17)	<i>S. mitis/oralis</i> (98.0)
YJ-03	<i>S. mitis</i> (100)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (2.04)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
GTC-05a	<i>S. mitis/pneumoniae</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. oralis</i> (2.03)	-
M30-02	<i>S. mitis/pneumoniae</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. pneumoniae</i> (98)	<i>S. pneumoniae/oralis/mitis</i> (2.29)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
GPC-01	<i>S. oralis</i> (99)	<i>S. oralis</i> (99)	<i>S. oralis</i> (99)	<i>S. pneumoniae/oralis/mitis</i> (2.80)	-
M26-03	<i>S. oralis</i> (98)	<i>S. peroris</i> (97)	<i>S. oralis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.87)	No identification
M494a-03	<i>S. oralis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (98)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (2.00)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
M537a-01	<i>S. oralis</i> (98)	<i>S. australis</i> (98)	<i>S. oralis</i> (98)	<i>S. pneumoniae</i> (2.17)	<i>S. mitis/oralis</i> (99.9)
S90-01	<i>S. oralis</i> (99)	<i>S. oralis</i> (98)	<i>S. oralis</i> (99)	<i>S. cristatus</i> (1.92)	-
CV-02	<i>S. oralis</i> (98)	<i>S. peroris</i> (97)	<i>S. infantis</i> (99)	<i>S. gordonii</i> (1.64)	-
Est-01	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (2.18)	-
Est-03	<i>S. parasanguinis</i> (98)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. lactarius</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (2.40)	-
M1-03	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (98)	<i>S. parasanguinis</i> (2.37)	-
M28-02	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (98)	<i>S. parasanguinis</i> (1.90)	-
M40-01	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (2.27)	-
M40-06	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (2.31)	-
M46-01	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. oralis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (98)	<i>S. parasanguinis</i> (1.97)	-
M50-02	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (2.30)	-

**Supplementary Table.** Results of the Sequence Analysis of 16S rRNA, *sodA* and *tuf* Genes and MALDI-TOF for the Identification of 105 *Streptococcus* Strains Isolated from Human Milk

Human Milk Isolates	16S rRNA (Sequence Similarity, %)	<i>sodA</i> (Sequence Similarity, %)	<i>tuf</i> (Sequence Similarity, %)	MALDI-TOF Bruker Biotyper (Score)	MALDI-TOF VITEK MS (Confidence Value)
<b>Mitis group</b>					
M79-04	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (97)	<i>S. parasanguinis</i> (2.29)	-
M111-05	<i>S. parasanguinis</i> (100)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. australis</i> (1.71)	-
M494a-02	<i>S. parasanguinis</i> (100)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (2.27)	-
M558-01	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (2.00)	-
M572-01	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (2.14)	-
M585-01	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (2.40)	-
M587-02	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (2.34)	-
S90-02	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (98)	<i>S. parasanguinis</i> (2.21)	-
YJ-01	<i>S. parasanguinis</i> (100)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (99)	<i>S. parasanguinis</i> (2.34)	-
CV-01	<i>S. peroris</i> (99)	<i>S. peroris</i> (99)	<i>S. peroris</i> (99)	<i>S. peroris</i> (1.78)	-
M8-01	<i>S. peroris</i> (99)	<i>S. peroris</i> (99)	<i>S. lactarius</i> (99)	<i>S. peroris</i> (2.31)	-
M27-03	<i>S. peroris</i> (99)	<i>S. infantis</i> (99)	<i>S. peroris</i> (98)	<i>S. peroris</i> (2.12)	-
M561-03	<i>S. pneumoniae</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. mitis</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (1.90)	<i>S. mitis/oralis</i> (98.0)
ZL-94-12	<i>S. pneumoniae</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (99)	<i>S. pneumoniae</i> (2.14)	-
<b>Salivarius group</b>					
CV-04	<i>S. salivarius</i> (100)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (100)	<i>S. salivarius</i> (2.11)	-
M5-01	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (1.79)	-
M5-02	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (2.16)	-
M15-02	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (98)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (2.20)	-
M15-03	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (98)	<i>S. salivarius</i> (1.92)	-
M16-02	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (2.00)	-
M27-01	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (2.21)	-



**Supplementary Table.** Results of the Sequence Analysis of 16S rRNA, *sodA* and *tuf* Genes and MALDI-TOF for the Identification of 105 *Streptococcus* Strains Isolated from Human Milk

Human Milk Isolates	16S rRNA (Sequence Similarity, %)	<i>sodA</i> (Sequence Similarity, %)	<i>tuf</i> (Sequence Similarity, %)	MALDI-TOF Bruker Biotyper (Score)	MALDI-TOF VITEK MS (Confidence Value)
<b>Salivarius group</b>					
M40-03	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (1.80)	-
M19-02	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. vestibularis</i> (94)	<i>S. vestibularis</i> (96)	<i>S. salivarius</i> (1.80)	-
M45-02	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. vestibularis</i> (95)	<i>S. vestibularis</i> (95)	<i>S. vestibularis</i> (2.06)	-
M46-02	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (1.92)	-
M63-02	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (2.20)	-
M494a-01	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (1.94)	-
M514-01	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (2.35)	-
M514c-02	<i>S. salivarius</i> (100)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (2.22)	-
M558-03	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (1.90)	-
M566-06	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (2.11)	-
M574-02	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. vestibularis</i> (95)	<i>S. vestibularis</i> (95)	<i>S. salivarius</i> (1.78)	-
M577-01c	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. vestibularis</i> (94)	<i>S. vestibularis</i> (96)	<i>S. salivarius</i> (2.04)	-
M586-01	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (1.86)	-
M580-02	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. vestibularis</i> (95)	<i>S. vestibularis</i> (95)	<i>S. vestibularis</i> (1.74)	-
M612-01	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (2.34)	-
M728-02	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (2.04)	-
YJ-02	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (2.15)	-
VPE-02	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (99)	<i>S. salivarius</i> (2.04)	-
GTC-01	<i>S. vestibularis</i> (100)	<i>S. vestibularis</i> (95)	<i>S. vestibularis</i> (95)	<i>S. vestibularis</i> (1.96)	-
M23-02	<i>S. vestibularis</i> (99)	<i>S. vestibularis</i> (99)	<i>S. vestibularis</i> (99)	<i>S. vestibularis</i> (2.19)	-
M44-05	<i>S. vestibularis</i> (99)	<i>S. vestibularis</i> (99)	<i>S. vestibularis</i> (99)	<i>S. vestibularis</i> (2.03)	-
M566-05	<i>S. vestibularis</i> (99)	<i>S. vestibularis</i> (100)	<i>S. vestibularis</i> (99)	<i>S. vestibularis</i> (2.18)	-

**Supplementary Table.** Results of the Sequence Analysis of 16S rRNA, *sodA* and *tuf* Genes and MALDI-TOF for the Identification of 105 *Streptococcus* Strains Isolated from Human Milk

Human Milk Isolates	16S rRNA (Sequence Similarity, %)	<i>sodA</i> (Sequence Similarity, %)	<i>tuf</i> (Sequence Similarity, %)	MALDI-TOF Bruker Biotyper (Score)	MALDI-TOF VITEK MS (Confidence Value)
<b>Mutans group</b>					
Est-02	<i>S. mutans</i> (99)	<i>S. mutans</i> (99)	<i>S. mutans</i> (99)	<i>S. mutans</i> (2.36)	-
<b>Pyogenic group</b>					
M3-01	<i>S. agalactiae</i> (99)	<i>S. agalactiae</i> (99)	<i>S. agalactiae</i> (99)	<i>S. agalactiae</i> (2.43)	-
M14-02	<i>S. pyogenes</i> (99)	<i>S. pyogenes</i> (99)	<i>S. pyogenes</i> (99)	<i>S. pyogenes</i> (2.13)	-



*V. Case-control study of risk factors for  
infectious mastitis in Spanish  
breastfeeding women*

Artículo publicado en  
*BMC Pregnancy and Childbirth (2014)*

---

*V. Factores de riesgo de la mastitis infecciosa  
en mujeres lactantes: estudio de casos y  
controles en población española*

Artículo publicado en  
*Acta Pediátrica Española (2015)*



RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Case-control study of risk factors for infectious mastitis in Spanish breastfeeding women

Pilar Mediano, Leónides Fernández, Juan M Rodríguez and María Marín\*

## Abstract

**Background:** The purpose of this study was to identify potential predisposing factors associated with human infectious mastitis.

**Methods:** We conducted a case-control study among breastfeeding women, with 368 cases (women with mastitis) and 148 controls. Data were collected by a questionnaire designed to obtain retrospective information about several factors related to medical history of mother and infant, different aspects of pregnancy, delivery and postpartum, and breastfeeding practices that could be involved in mastitis. Bivariate analyses and multivariate logistic regression model were used to examine the relationship between mastitis and these factors.

**Results:** The variables significantly- and independently-associated with mastitis were cracked nipples ( $P < 0.0001$ ), oral antibiotics during breastfeeding ( $P < 0.0001$ ), breast pumps ( $P < 0.0001$ ), topical antifungal medication during breastfeeding ( $P = 0.0009$ ), mastitis in previous lactations ( $P = 0.0014$ ), breast milk coming in later than 24 h postpartum ( $P = 0.0016$ ), history of mastitis in the family ( $P = 0.0028$ ), mother-infant separation longer than 24 h ( $P = 0.0027$ ), cream on nipples ( $P = 0.0228$ ) and throat infection ( $P = 0.0224$ ).

**Conclusions:** Valuable factors related to an increased risk of infectious mastitis have been identified. This knowledge will allow practitioners to provide appropriate management advice about modifiable risk factors, such as the use of pumps or inappropriate medication. They also could identify before delivery those women at an increased risk of developing mastitis, such as those having a familial history of mastitis, and thus develop strategies to prevent this condition.

**Keywords:** Breastfeeding, Infectious mastitis, Risk factors, Public health, Epidemiology

## Background

Infectious mastitis is a common condition that affects up to 33% of women during lactation, although its incidence may be underestimated because of differences in case definition and reporting [1-4]. However, as it has recently been addressed [5], most of the studies have not reported the true mastitis incidence to date, since it would be necessary to define a time limit for the collection of data and to know the size of the population at risk, that is, breastfeeding mothers in the area of study. On one hand, the term “infectious mastitis” has been applied only to acute cases, with both local (breast redness, engorgement and pain) and systemic symptoms; however, subacute mastitis, that include only local symptoms

and are often characterized by a reduced milk secretion, have been systematically underreported. On the other hand, human milk cultures are rarely performed and, therefore, there are not standardized sampling and analysis procedures [6].

Lactational mastitis constitutes one of the main medical causes of premature weaning due to pain and discomfort or as a result of inappropriate advice of a health professional [7,8]. Since breastfeeding provides a wide range of health benefits for the mother-infant pair [9-11], mastitis constitutes a relevant Public Health issue [6,12]. Some epidemiologic studies have been carried out to investigate the incidence and the potential risk factors that could be involved in infectious lactational mastitis [1,3,7,13-15]. Risk factors that have been suggested to be strongly associated to mastitis include, among others, mastitis with a previous child, cracked or sore nipples,

\* Correspondence: mllmarin@vet.ucm.es  
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos,  
Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

use of ointments, inappropriate breastfeeding practices, and peripartum antibiotherapy [1,4,13-15].

In Spain, the most recent National Survey of Health available (2011–2012) showed that the estimated prevalence of exclusive (mixed) breastfeeding was 66.2 (72.4)%, 53.6 (66.6)% and 28.5 (46.9)% at 6 weeks, 3 months and 6 months, respectively, after birth [16]. On the other hand, Spain ranks regular (24 out of 36) in the *Breastfeeding Policy Scorecard for Developed Countries* published recently [17] according to maternity leave laws and right to daily nursing breaks, among other indicators. Furthermore, the number of centers that hold the *Baby Friendly Hospital* designation as institutions that promote breastfeeding, as well as the *Breastfeeding Support Groups*, has increased during the last decade. However, in contrast to this renewed interest that breastfeeding and human milk are receiving nowadays, lactational mastitis still remains widely unknown to the medical community, including the Spanish practitioners. In this sense, the *Recommendations on Breastfeeding of the Lactation Committee of the Spanish Association of Paediatrics* [18] do not even mention mastitis as a common condition during lactation and one of the main medical causes of premature weaning.

In this study, a broad range of risk factors have been evaluated in a Spanish population. We have addressed some risks factors from literature and others that have not been taken in account in previous studies. To our knowledge this is the first large epidemiological study about risk factors for infectious mastitis among lactating women in a Spanish population.

## Methods

### Subject selection

Cases ( $n = 368$ ) who participated in this retrospective case-control study by filling out a questionnaire about mastitis risk factors, were recruited from 1080 lactating women with clinical symptoms of infectious mastitis who attended our laboratory from September 2009 to June 2011 to have a breast milk sample analyzed in the context of a study about microbiology of human mastitis.

They were referred to our laboratory by lactation consultants and midwives attending different health-care centers in Spain and all cases included either both local (breast redness, pain and engorgement) and systemic symptoms (fever or flu-like symptoms) or only local symptoms (pain, engorgement, reduced milk secretion). Patients suffering from Raynaud's syndrome, mammary abscesses or any other mammary pathology were excluded from the study. The diagnosis of mastitis was confirmed by milk cultures that were plated onto ready-to-use Baird Parker (selective medium for staphylococci isolation) and Columbia Blood Agar for isolation of streptococci, staphylococci, corynebacteria and related bacteria. Violet Red Bile Glucose Agar was used for isolation of

enterobacteria and other Gram-negative bacteria in order to confirm that the milk samples had not been contaminated. The plates were incubated at 37°C for 48 h and to reach a positive diagnosis of mastitis the following microbiological criteria was established: *Staphylococcus aureus* > 150 CFU/mL, coagulase-negative staphylococci (mainly *Staphylococcus epidermidis*) > 1000 CFU/mL and viridans streptococci (mainly *Streptococcus mitis* and *Streptococcus salivarius*) > 1000 CFU/mL [19].

Midwives and lactation consultants were also asked to recruit healthy breastfeeding women with no clinical symptoms of mastitis during current lactation as the control group. In order to verify the absence of mastitis in the controls, breast milk samples were also cultured in the same media as mastitis samples. The mammary microbiota in controls was characterized by the presence of a relatively heterogeneous population at a moderated concentration (<1000 CFU/mL) and <10<sup>3</sup> white blood cells per mL of milk. Informed consent to the protocol approved by the Ethical Committee of Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain) was obtained from the women involved in this study.

Cases and controls (all of them with full-term pregnancy and healthy children) were asked to fill out a questionnaire with precoded and open-ended questions designed to collect retrospective information on demographic characteristics, medical history of mother and infant, different aspects of pregnancy, delivery and postpartum, and breastfeeding practices (Tables 1, 2, 3 and 4). The questionnaire was completed and returned by 368 out of 1080 cases (34%) and 148 out of 256 controls (58%).

### Statistical analysis

Continuous variables were expressed as means and 95% confidence intervals (95% CI) and percentages were calculated for categorical variables. Comparison of continuous and categorical variables in both control and mastitis groups was done using Student's t-test and chi-squared test, respectively, and any statistically significant difference was noted. Fisher's exact test was used as appropriate. Odds Ratio (OR) associated with each potential factor involved in mastitis (risk or protective factor) and 95% CI were calculated to compare exposures in each group. For the purpose of the study,  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

The relationship between mastitis risk and seventy-eight variables was first examined by bivariate analysis. To analyze the strength of association between mastitis and the potential risk factors, most factors that were statistically significant in the bivariate analysis, based on a  $P < 0.05$  significance level (thirty-four variables), were used in a multivariate logistic regression model using the maximum likelihood method of the LOGISTIC procedure of SAS. Variables were included one at a time in the multivariate model using the forward stepwise

**Table 1 Medical history of women participating in the study**

Variables	Case, n* (%)	Control, n* (%)	OR	95% CI	P-value
<b>Blood type</b>					
A	158 (44.13)	74 (52.11)	Reference		0.369
B	28 (7.82)	12 (8.45)	1.09	0.53–2.27	
AB	19 (5.31)	5 (3.52)	1.78	0.64–4.95	
O	153 (42.74)	51 (35.92)	1.41	0.92–2.14	
<b>Rh factor</b>					
Positive	275 (78.13)	121 (85.82)	Reference		0.052
Negative	77 (21.88)	20 (14.18)	1.69	0.99–2.90	
<b>Mastitis in the family</b>					
No	191 (62.01)	120 (83.92)	Reference		< 0.001
Yes	117 (37.99)	23 (16.08)	3.20	1.93–5.28	
<b>Mastitis in previous breastfeedings**</b>					
No	53 (48.62)	54 (87.10)	Reference		< 0.001
Yes	56 (51.38)	8 (12.90)	7.13	3.10–16.39	
<b>Breast cancer in the family</b>					
No	265 (74.44)	99 (68.28)	Reference		0.161
Yes	91 (25.56)	46 (31.72)	0.74	0.48–1.13	
<b>Breast surgery</b>					
No	341 (94.99)	141 (97.24)	Reference		0.378
Yes	18 (5.01)	4 (2.76)	1.86	0.62–5.60	
<b>Gastrointestinal disease</b>					
No	267 (74.17)	113 (76.87)	Reference		0.524
Yes	93 (25.83)	34 (23.13)	1.16	0.74–1.82	
<b>Urinary infection</b>					
No	286 (78.36)	128 (86.49)	Reference		0.035
Yes	79 (21.64)	20 (13.51)	1.77	1.04–3.01	
<b>Vaginal candidiasis</b>					
No	279 (76.23)	127 (85.81)	Reference		0.016
Yes	87 (23.77)	21 (14.19)	1.89	1.12–3.17	
<b>Eye infection</b>					
No	335 (91.78)	139 (93.92)	Reference		0.408
Yes	30 (8.22)	9 (6.08)	1.38	0.64–2.99	
<b>Ear infection</b>					
No	350 (95.89)	145 (97.97)	Reference		0.370
Yes	15 (4.11)	3 (2.03)	2.07	0.59–7.26	
<b>Lip or nose infection</b>					
No	285 (77.87)	125 (84.46)	Reference		0.092
Yes	81 (22.13)	23 (15.54)	1.54	0.93–2.57	
<b>Throat infection</b>					
No	258 (70.88)	126 (85.71)	Reference		< 0.001
Yes	106 (29.12)	21 (14.29)	2.47	1.47–4.12	



**Table 1 Medical history of women participating in the study (Continued)**

<b>Skin infection</b>					
No	301 (82.47)	137 (92.57)	Reference		0.003
Yes	64 (17.53)	11 (7.43)	2.65	1.35–5.18	
<b>Allergies</b>					
No	250 (68.31)	106 (71.62)	Reference		0.461
Yes	116 (31.69)	42 (28.38)	1.17	0.77–1.78	
<b>Autoimmune disease</b>					
No	352 (96.17)	146 (98.65)	Reference		0.237
Yes	14 (3.83)	2 (1.35)	2.90	0.65–12.94	
<b>Asthma</b>					
No	347 (94.81)	140 (94.59)	Reference		0.922
Yes	19 (5.19)	8 (5.41)	0.96	0.41–2.24	
<b>Anemia</b>					
No	305 (83.33)	135 (91.84)	Reference		0.013
Yes	61 (16.67)	12 (8.16)	2.25	1.17–4.32	
<b>Gestational diabetes</b>					
No	342 (93.96)	139 (93.92)	Reference		0.987
Yes	22 (6.04)	9 (6.08)	0.99	0.45–2.21	
<b>Thyroid disease</b>					
No	335 (91.78)	133 (89.86)	Reference		0.487
Yes	30 (8.22)	15 (10.14)	0.79	0.41–1.52	
<b>Smoker</b>					
No	291 (80.17)	116 (78.38)	Reference		0.649
Yes	72 (19.83)	32 (21.62)	0.90	0.56–1.43	
<b>Social drinker</b>					
No	195 (54.17)	84 (57.14)	Reference		0.541
Yes	165 (45.83)	63 (42.86)	1.13	0.77–1.66	

Cases and controls were asked to present any of these medical conditions from 6 months before pregnancy to delivery.

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

\*The number of cases varies because of missing data.

\*\*Data from primiparous women were excluded for this analysis.

procedure, adding the predictor with the largest score statistic. Variables which were significant by the Wald statistic at  $P < 0.05$  were included in the final model. Adjusted OR (AOR) and 95% CI were calculated for the selected variables in the multivariate logistic regression model. Adequacy of the multivariate model was estimated by Hosmer-Lemeshow test and the area under the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve.

The Statgraphics Centurion XVI software (16.1.03) (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA) and the SAS software, version 9.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) were used for these analyses.

## Results

A total of 368 cases (mastitis) and 148 controls (healthy women) were included in the study after filling out a

questionnaire designed to collect retrospective information about different factors that could be involved in mastitis.

Concerning demographic characteristics, there were no significant differences between case and control subjects with regard to mean age at last delivery (cases: 33.7 years, 95% CI: 33.01–34.19; controls: 33.6 years, 95% CI: 33.32–34.12;  $P = 0.756$ ), infant weight (cases: 3.33 kg, 95% CI: 3.28–3.35; controls: 3.32 kg, 95% CI: 3.27–3.38;  $P = 0.786$ ) and infant size (cases: 49.83 cm, 95% CI: 49.64–50.02; controls: 50.17 cm, 95% CI: 49.87–50.46;  $P = 0.186$ ). However, the mean infant age when the mother completed the questionnaire was significantly different ( $P < 0.001$ ) between cases (3.35 months; 95% CI: 2.91–3.79) and controls (6.68 months; 95% CI: 5.93–7.42).

The bivariate analysis for qualitative variables that could be related to mastitis is shown in Tables 1, 2, 3

**Table 2 Medical history of breastfed infants participating in the study**

Variables	Case, n* (%)	Control, n* (%)	OR	95% CI	P-value
<b>Sex</b>					
Female	157 (42.90)	78 (52.70)	Reference		
Male	209 (57.10)	70 (47.30)	1.48	1.01–2.18	0.043
<b>Blood type</b>					
A	104 (39.69)	51 (48.11)	Reference		
B	29 (11.07)	4 (3.77)	3.56	1.19–10.66	0.011
AB	16 (6.11)	1 (0.94)	7.85	1.01–60.82	
O	113 (43.13)	50 (47.17)	1.11	0.69–1.78	
<b>Rh factor</b>					
Positive	240 (91.60)	100 (94.34)	Reference		
Negative	22 (8.40)	6 (5.66)	1.53	0.60–3.88	0.370
<b>APGAR test</b>					
< 9	26 (7.60)	3 (2.26)	Reference		
> 9	316 (92.40)	130 (97.74)	0.28	0.08–0.94	0.049
<b>Jaundice</b>					
No	244 (67.22)	109 (74.15)	Reference		
Yes	119 (32.78)	38 (25.85)	1.40	0.91–2.15	0.125
<b>Hypoglycemia</b>					
No	357 (97.01)	143 (96.62)	Reference		
Yes	11 (2.99)	5 (3.38)	0.88	0.30–2.58	0.818
<b>Eczema</b>					
No	347 (94.29)	141 (95.27)	Reference		
Yes	21 (5.71)	7 (4.73)	1.22	0.51–2.93	0.658
<b>Thrush</b>					
No	328 (89.13)	143 (96.62)	Reference		
Yes	40 (10.87)	5 (3.38)	3.49	1.35–9.02	0.006
<b>Micrognathia/Retrognathia</b>					
No	355 (96.47)	147 (99.32)	Reference		
Yes	13 (3.53)	1 (0.68)	5.38	0.70–41.52	0.132
<b>Tongue-tie</b>					
No	255 (71.63)	134 (90.54)	Reference		
Yes	101 (28.37)	14 (9.46)	3.79	2.09–6.89	< 0.001
<b>Child hospitalized after birth</b>					
No	323 (90.73)	134 (96.40)	Reference		
Yes	33 (9.27)	5 (3.60)	2.74	1.05–7.16	0.033

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

\*The number of cases varies because of missing data.

and 4, where the results are presented as percentages, ORs and 95% CI.

The factors related to the medical history of the women participating in this study are shown in Table 1. Compared with controls, a history of mastitis in the family (OR: 3.20) or in previous lactations (OR: 7.13) were strongly associated with a higher risk of mastitis. There were no significant differences between the case patients

and the control subjects with regard to blood type, Rh factor, history of breast cancer in the family, breast surgery or the presence of a gastrointestinal disease.

Women with mastitis were more likely to report urinary infection (OR: 1.77) and vaginal candidiasis (OR: 1.89) than controls, as well as throat (OR: 2.47) and skin infection (OR: 2.65). In addition, significantly more case-patients than controls reported anemia (OR: 2.25). No

**Table 3 Pregnancy, delivery and postpartum characteristics of participants in this study**

Variables	Case, n* (%)	Control, n* (%)	OR	95% CI	P-value
<b>Threatened miscarriage</b>					
No	308 (85.08)	135 (91.22)	Reference		0.063
Yes	54 (14.92)	13 (8.78)	1.82	0.96–3.45	
<b>Breast/nipple pain during pregnancy</b>					
No	249 (70.94)	117 (80.14)	Reference		0.034
Yes	102 (29.06)	29 (19.86)	1.65	1.04–2.64	
<b>Antibiotics during pregnancy</b>					
No	271 (77.87)	122 (82.43)	Reference		0.252
Yes	77 (22.13)	26 (17.57)	1.33	0.81–2.18	
<b>Antifungal medication during pregnancy</b>					
No	317 (89.30)	138 (93.24)	Reference		0.170
Yes	38 (10.70)	10 (6.76)	1.65	0.80–3.41	
<b>Analgesics during pregnancy</b>					
No	233 (64.36)	105 (71.43)	Reference		0.126
Yes	129 (35.64)	42 (28.57)	1.38	0.91–2.10	
<b>Group B <i>Streptococcus</i> positive test</b>					
No	278 (79.89)	115 (80.99)	Reference		0.781
Yes	70 (20.11)	27 (19.01)	1.07	0.65–1.76	
<b>Age range at last delivery</b>					
< 25	5 (1.37)	5 (3.45)	Reference		0.305
25–35	242 (66.12)	95 (65.52)	2.55	0.72–9.00	
> 35	119 (32.51)	45 (31.03)	2.64	0.73–9.57	
<b>Primiparous/Multiparous</b>					
Multiparous	113 (30.87)	62 (42.18)	Reference		0.015
Primiparous	253 (69.13)	85 (57.82)	1.63	1.10–2.43	
<b>Place of delivery</b>					
Private clinic	118 (33.71)	25 (17.01)	Reference		0.021
Public hospital	224 (64.00)	113 (76.87)	0.42	0.26–0.68	
Home	8 (2.29)	9 (6.12)	0.19	0.07–0.54	
<b>Type of delivery</b>					
Vaginal	267 (76.95)	125 (85.03)	Reference		0.042
Caesarean section	80 (23.05)	22 (14.97)	1.70	1.01–2.86	
<b>Antibiotherapy during delivery</b>					
No	201 (57.59)	100 (67.57)	Reference		0.038
Yes	148 (42.41)	48 (32.43)	1.53	1.02–2.30	
<b>Epidural analgesia during delivery</b>					
No	73 (20.17)	48 (32.43)	Reference		0.003
Yes	289 (79.83)	100 (67.57)	1.90	1.24–2.92	

**Table 3 Pregnancy, delivery and postpartum characteristics of participants in this study (Continued)**

<b>First contact with child</b>					
Immediately	243 (66.21)	114 (77.51)	Reference		0.019
10-60 min	78 (21.25)	25 (17.01)	1.46	0.89–2.42	
> 60 min	46 (12.53)	8 (5.44)	2.70	1.23–5.90	
<b>Separation child-mother longer than 24 h</b>					
No	330 (89.92)	144 (97.30)	Reference		0.009
Yes	37 (10.08)	4 (2.70)	4.04	1.41–11.53	

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

\*The number of cases varies because of missing data.

significant differences were found between both groups regarding smoking or drinking habit.

Some factors related to the infant medical history are shown in Table 2. Infant blood type B was significantly more reported by women with mastitis compared to controls (OR: 3.56). No differences were found related to Rh factor. However, there was a marginally significant difference regarding child gender, so that more case-patients declared to give birth to a male child compared to controls (OR: 1.48). APGAR test score > 9 was found to be a barely significant protective factor (OR: 0.28).

No significant differences were observed in relation to jaundice, hypoglycemia, eczema or micrognathia/retrognathia, but significantly more infants from mothers with mastitis suffered oral thrush (OR: 3.49). The presence of tongue-tie in the infant (OR: 3.79) and infant hospitalization after birth (OR: 2.74) were significantly more reported in the mastitis group.

Characteristics of pregnancy, delivery and postpartum are shown in Table 3. There was not a statistically significant difference between cases and controls related to a threatened miscarriage. In contrast, a history of breast/nipple pain during pregnancy was significantly more common among women with mastitis (OR: 1.65).

The use of antibiotics, antifungal treatment and analgesics during pregnancy between cases and controls was not statistically different. However, antibiotherapy (OR: 1.53) and epidural analgesia (OR: 1.90) during delivery were significantly more widely administered to women reporting mastitis. There were no age-related significant differences at delivery, but primiparous women were found significantly more often in the mastitis group (69.13%) than in the control group (57.82%).

Place and type of delivery also showed significant differences between cases and controls. Delivery in a public hospital (OR: 0.42) had a significant protective effect compared to delivery in a private clinic, while Caesarean sections were performed on women in the mastitis group at significantly higher frequency (23.05%) than on those in the control group (14.97%).

Contact with the infant immediately after birth was more likely reported by controls (77.51%) than cases (66.21%),

while the mastitis group reported more often (12.53%) that the first contact took at least one hour after birth compared to controls (5.44%). A higher risk of mastitis was noted when the infant was separated from the mother for more than 24 h (OR: 4.04).

Breastfeeding characteristics and practices are shown in Table 4. Breastfeeding started immediately after birth significantly more often in controls than in cases (83.56% and 71.58%, respectively). Exclusive breastfeeding (OR: 0.32) and breastfeeding twins/tandem nursing (OR: 0.26) were also more common in the control group. Women having children with latching problems were about 2.7 times more likely to report mastitis (OR: 2.68), and similar results were found if there was a delay of several days in breast milk coming in (OR: 2.77). Perceiving a low milk supply (OR: 3.19) or an oversupply (OR: 1.54) also turned out to be described significantly most often by women suffering from mastitis.

Women with mastitis were more likely to use more breastfeeding positions (39.61%) than controls (27.78%) although it may be a consequence of the pain while breastfeeding. In addition, breastfeeding longer than 45 minutes was significantly associated with mastitis (OR: 4.77).

The use of pacifiers, bottle-feeding or nipple shields, that might interfere with proper suckling in some situations, was significantly more frequent among cases (approximately 1.6 times (OR: 1.58), 4.10 times (OR: 4.10) and 4.4 times (OR: 4.36) higher, respectively). The number of controls reporting flat or inverted nipples was insufficient to describe precisely the relationship between this condition and the risk of mastitis. Other breastfeeding practices strongly linked to women with mastitis included the use of creams (OR: 3.39) and pumps (OR: 3.47).

Women were asked to rate cracked nipples on a 5-point scale, from 1 (no cracked nipples) to 5 (severely cracked nipples). Cracked nipples rated 3 to 5 were more frequently reported by women with mastitis compared to controls, especially severely cracked ones (OR: 7.03).

Use of oral antibiotic (OR: 4.58) and topical antifungal (OR: 2.67) drugs was significantly associated with mastitis. Use of analgesics (OR: 1.94) and non-steroidal anti-

**Table 4 Breastfeeding characteristics and practices of the women involved in this study**

Variables	Case, n* (%)	Control, n* (%)	OR	95% CI	P-value
<b>First breastfeed after birth</b>					
Not immediately	104 (28.42)	24 (16.44)	Reference		0.005
Immediately	262 (71.58)	122 (83.56)	0.50	0.30–0.81	
<b>Problems to latch on the nipple at first</b>					
No	250 (67.93)	125 (85.03)	Reference		< 0.001
Yes	118 (32.07)	22 (14.97)	2.68	1.62–4.44	
<b>Time until the milk come in</b>					
Hours	50 (13.77)	42 (29.17)	Reference		< 0.001
One day	66 (18.18)	27 (18.75)	2.05	1.12–3.77	
Several days	247 (68.04)	75 (52.08)	2.77	1.70–4.49	
<b>Breast milk amount</b>					
Normal	185 (50.27)	94 (63.95)	Reference		0.006
Oversupply	139 (37.77)	48 (31.29)	1.54	1.01–2.33	
Low supply	44 (11.96)	7 (4.76)	3.19	1.39–7.36	
<b>Types of breastfeeding</b>					
Mixed	272 (75.35)	14 (9.52)	Reference		< 0.001
Exclusive	89 (24.65)	133 (90.48)	0.32	0.18–0.59	
<b>Breastfeeding twins/Tandem nursing</b>					
No	349 (96.41)	126 (87.50)	Reference		< 0.001
Yes	13 (3.59)	18 (12.50)	0.26	0.12–0.55	
<b>Breastfeeding positions</b>					
1	48 (13.30)	22 (15.28)	1.05	0.60–1.86	0.043
2	170 (47.09)	82 (56.94)	Reference		
3	143 (39.61)	40 (27.78)	1.72	1.11–2.67	
<b>Breastfeeding length</b>					
5-15 min	71 (26.59)	36 (41.38)	Reference		< 0.001
15-30 min	112 (41.95)	38 (43.68)	1.49	0.87–2.58	
30-45 min	37 (13.86)	8 (9.20)	2.35	0.99–5.56	
> 45 min	47 (17.60)	5 (5.75)	4.77	1.74–13.03	
<b>Time since breastfeeding started</b>					
< 2 weeks	31 (8.59)	3 (2.59)	Reference		< 0.001
2-4 weeks	61 (16.90)	8 (6.90)	0.74	0.18–2.98	
1-3 months	161 (44.60)	22 (18.97)	0.71	0.20–2.51	
3-6 months	52 (14.40)	51 (43.97)	0.10	0.03–0.34	
6-12 months	30 (8.31)	15 (12.93)	0.19	0.05–0.74	
> 12 months	26 (7.20)	17 (14.66)	0.15	0.04–0.56	
<b>Breast preference</b>					
No	233 (64.19)	104 (71.23)	Reference		0.129
Yes	130 (35.81)	42 (28.77)	1.38	0.91–2.10	
<b>Consecutive feeds start with same breast</b>					
No	331 (92.72)	137 (93.84)	Reference		0.655
Yes	26 (7.28)	9 (6.16)	1.20	0.55–2.62	

**Table 4 Breastfeeding characteristics and practices of the women involved in this study (Continued)**

<b>One or two breast in each session</b>					
1	138 (43.13)	54 (40.30)	Reference		0.578
2	182 (56.88)	80 (59.70)	0.89	0.59–1.34	
<b>Child skips one breastfeed session</b>					
No	274 (96.14)	117 (99.15)	Reference		0.195
Yes	11 (3.86)	1 (0.85)	4.70	0.60–36.80	
<b>Pacifier</b>					
No	235 (66.38)	112 (75.68)	Reference		0.040
Yes	119 (33.62)	36 (24.32)	1.58	1.02–2.44	
<b>Nipple shields</b>					
No	291 (82.20)	141 (95.27)	Reference		< 0.001
Yes	63 (17.80)	7 (4.73)	4.36	1.95–9.77	
<b>Bottle-feeding</b>					
No	260 (73.45)	136 (91.89)	Reference		< 0.001
Yes	94 (26.55)	12 (8.11)	4.10	2.17–7.74	
<b>Flat or inverted nipples</b>					
No	323 (91.24)	147 (99.32)	Reference		0.002
Yes	31 (8.76)	1 (0.68)	14.11	1.91–104.34	
<b>Cream on nipples</b>					
No	171 (47.63)	108 (75.52)	Reference		< 0.001
Yes	188 (52.37)	35 (24.48)	3.39	2.20–5.24	
<b>Breast pumps</b>					
No	143 (39.29)	101 (69.18)	Reference		< 0.001
Yes	221 (60.71)	45 (30.82)	3.47	2.30–5.22	
<b>Breast pads</b>					
No	116 (32.77)	56 (38.89)	Reference		0.193
Yes	238 (67.23)	88 (61.11)	1.31	0.87–1.95	
<b>Brassier use</b>					
Day and night	170 (48.99)	72 (54.96)	Reference		0.244
Only day	177 (51.01)	59 (45.04)	1.27	0.85–1.90	
<b>Cracked nipples (1–5)**</b>					
1	73 (19.84)	77 (52.03)	Reference		< 0.001
2	42 (11.41)	26 (17.57)	1.70	0.95–3.06	
3	50 (13.59)	12 (8.11)	4.39	2.17–8.91	
4	43 (11.68)	9 (6.08)	5.04	2.30–11.07	
5	160 (43.48)	24 (16.22)	7.03	4.02–12.01	
<b>Antibiotics during breastfeeding</b>					
No	207 (56.71)	126 (85.71)	Reference		< 0.001
Yes	158 (43.29)	21 (14.29)	4.58	2.76–7.60	
<b>Antifungal medication during breastfeeding</b>					
No	280 (76.71)	132 (89.80)	Reference		< 0.001
Yes	85 (23.29)	15 (10.20)	2.67	1.49–4.80	
<b>Analgesics during breastfeeding</b>					
No	217 (58.97)	109 (73.65)	Reference		< 0.001
Yes	151 (41.03)	39 (26.35)	1.94	1.28–2.96	

**Table 4 Breastfeeding characteristics and practices of the women involved in this study (Continued)**

<b>Non-steroidal anti-inflammatory drugs</b>					
No	218 (59.24)	119 (80.41)	Reference		< 0.001
Yes	150 (40.76)	29 (19.59)	2.82	1.79–4.45	
<b>Corticosteroids</b>					
No	355 (96.47)	146 (98.65)	Reference		0.297
Yes	13 (3.53)	2 (1.35)	2.67	0.60–11.99	

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

\*The number of cases varies because of missing data.

\*\*Cracked nipples were rated from 1 (no cracked) to 5 (severely cracked).

inflammatory drugs (OR: 2.82) also showed significant differences between cases and controls. Oral corticosteroid therapies did not yield a significant difference since their use was very low among the analyzed sample.

All statistical significant variables related to mother medical history (Table 1) and pregnancy, delivery and postpartum characteristics (Table 3) were included in the multivariable logistic regression model. However, 8 variables with a  $P$  value < 0.05 were excluded from the multivariable analysis for several reasons. Regarding infant medical history (Table 2) the following were not included: sex and APGAR test (marginally significant difference), blood type (small sample size in controls), tongue tie (condition underrated in the control group) and child hospitalized after birth, because all of them were separated from their mother longer than 24 h and this factor was included in the multivariable analysis. Concerning breastfeeding characteristics and practices (Table 4) the variables not included were: breastfeeding positions (clearly linked to pain in women with mastitis), flat or inverted nipples (small sample size in controls) and breastfeeding length.

AOR, 95% CI, and  $P$  values of the multivariate logistic-regression model determined by forward stepwise selection are shown in Table 5. After adjustment for potentially correlated covariates, the factors significantly- and independently-associated with mastitis were history of mastitis in the family (AOR: 2.28), mastitis in previous lactations (AOR: 3.91) and throat infection (AOR: 2.05), in relation to the history of the mother. A mother-infant separation longer than 24 h after birth increased the risk of suffering mastitis about 6 times (AOR: 6.40). Regarding breastfeeding, the variables most significantly- and independently-associated with mastitis were infant age (AOR: 0.92), breast milk coming in later than 24 h postpartum (AOR: 2.26), cracked nipples (AOR: 1.43) and use of creams (AOR: 1.91), breast pumps (AOR: 2.78), oral antibiotics (AOR: 5.38) and topical antifungal medication (AOR: 3.81).

The Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test showed a Chi-square of 7.32 ( $P = 0.503$ ) and the area under the ROC curve was 0.870 (95% CI = 0.835–0.904), which means that the model presented a good fit and a good adjustment.

**Table 5 Risk factors for mastitis according to multiple logistic regression analysis**

Variables	Adjusted OR	95% CI	P-value
Cracked nipples	1.43	1.23–1.67	< 0.0001
Antibiotics during breastfeeding	5.38	2.85–10.14	< 0.0001
Infant age	0.92	0.87–0.96	< 0.0001
Breast pumps	2.78	1.68–4.58	< 0.0001
Antifungal medication during breastfeeding	3.81	1.35–10.76	0.0009
Mastitis in previous breastfeeding	3.91	1.60–9.56	0.0014
Breast milk coming in later than 24 h	2.26	1.24–4.12	0.0016
Mastitis in the family	2.28	1.26–4.13	0.0028
Separation child-mother longer than 24 h	6.40	1.77–23.18	0.0027
Cream on nipples	1.91	1.13–3.24	0.0228
Throat infection	2.05	1.10–3.80	0.0224

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

The following variables have been included in the analysis: infant age; mastitis in the family and in previous breastfeeding; urinary, throat and skin infection; vaginal candidiasis; anemia; thrush; breast/nipple pain during pregnancy; parity; place and type of delivery; antibiotherapy and analgesia during delivery; first contact with child; separation child-mother longer than 24 h; first breastfeed after birth; problems to latch on nipple at first; time until the milk comes in; milk amount; mixed/exclusive breastfeeding; breastfeeding two children; time since breastfeeding started; pacifier; nipple shields; bottle-feeding; cream on nipples; breast pumps; cracked nipples; antibiotics, antifungal medication, analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs during breastfeeding.



## Discussion

The purpose of this case-control investigation was to identify factors associated with mastitis, including potential risk or protective factors. Among them, the separation of the infant from his mother longer than 24 h after birth due to hospitalization or for any other reason increased the risk of mastitis. This highlights the crucial importance of the first postnatal hours for establishing mother-infant interaction. Among other aspects of pregnancy, delivery and postpartum, Caesarean delivery and antibiotherapy during delivery as well as the use of epidural analgesia in labor were more frequently reported by mothers with mastitis, although these factors were not included in the final model obtained after the multivariable analysis. In this sense, a negative association between Caesarean delivery and breastfeeding exists because postoperative care routines delay the onset of lactation, disrupt mother-infant interaction and inhibit infant suckling [20]. Peripartum antibiotherapy has emerged as a strong risk factor for human mastitis because it induces the selection for antibiotic-resistant bacteria in the mammary gland and the elimination of potential competitors [21,22]. Antibiotics also affect vaginal and intestinal microbiota of the mother [22] and the development of intestinal microbiota in the infant [23]. The link between epidural intrapartum analgesia and breastfeeding difficulties has also been debated [24-26], but there are not conclusive evidences and further studies are required.

Another relevant factor associated with mastitis was the use of antibiotics during breastfeeding. In fact, widespread use of broad spectrum antibiotics is leading to increasing rates of antimicrobial resistance among mastitis-causing agents [27-29]. On the other hand, biofilm formation is an important virulence factor of the strains implicated in mastitis, taking in account that the penetration capacity through bacterial biofilms depends on each antibiotic [30]. Resistance to antibiotics and ability to form biofilms are common findings among mastitis-causing strains and may explain the often recurrent nature of this infectious condition [21]. This fact emphasizes the need of a milk culture and antibiogram for a rational treatment of mastitis [19,31]. Widespread antibiotic therapy used to treat throat infections could also affect the mammary gland microbiota and lead to mastitis. Conversely, broad range antibiotics to treat mastitis are linked to a variety of adverse effects, including urinary infections and vaginal candidiasis [32]. Microbial habitats in the human body, including the skin, constitute a network of interrelated communities [33]. This could explain why pathogens involved in throat and urinary infections may spread to the mammary gland and those implicated in mastitis development may spread to throat and urinary tract. In this work, the bivariate analysis revealed that urinary and skin infections were also more frequent among breastfeeding mothers with

mastitis. Interestingly, anemia was also more common in the group of women with mastitis, since women suffering from anemia might be more vulnerable to infections. In addition, iron supplements enhance growth and virulence of *Staphylococcus aureus* and other mastitis-associated species [34]; as a consequence, women receiving them may also be more prone to mastitis. No clinical trials have evaluated the impact of iron supplementation on mastitis but the study of iron acquisition pathways seems to be a good target to define the underlying mechanisms of mastitis severity [35].

Significantly, a history of mastitis with a previous infant also seems to be a strong mastitis predictor [1,14] and, in our study, this factor was associated with an almost four-fold risk of mastitis in the multivariate analysis. Breast health depends on a balanced interaction between the host and its microbiota [36,37]. Since the milk bacterial profile is host-specific [36,38,39], there could be a mammary microbiota more prone to mastitis development [6]. In fact, *S. epidermidis*, an underrated cause of mastitis, lives at the edge between commensalism and pathogenicity and requires a predisposed host to transform itself into a notorious pathogen [40,41]. On the other hand, several oligosaccharides involved in the mucosal immune system are present in human milk [42]. Therefore, differences in profile and concentration of such compounds may explain a differential host susceptibility to develop mastitis [43].

Our results indicate that a familial occurrence of mastitis is a significant risk factor for the disease, which suggests the role of a genetic predisposition in the development of mastitis. The existence of a genetic basis for host responses to bacteria involved in mastitis has been widely documented in cattle and sheep mastitis [44,45], although the underlying mechanisms are still largely unknown. The first association between human granulomatous mastitis caused by *Corynebacterium kroppenstedtii* and a single nucleotide polymorphism (SNP) related to defective neutrophil responses has been recently described [46], which opens new fields for further investigation in human mastitis.

In our work, antifungal medication during breastfeeding was strongly linked to mastitis. Antifungal ointments are often prescribed to treat "mammary candidiasis" on the basis of visual assessment, without a microbiological analysis. Actually, yeasts are an extremely rare cause of lactational mastitis in any mammalian species and there is lack of evidence to reach such a diagnosis [47-49]. It is interesting to note, however, that there is an association between staphylococcal/streptococcal mastitis and candidiasis (oral thrush) in the infant since a high concentration of such bacteria can induce *Candida albicans* overgrowth. *C. albicans* and streptococci form a synergistic partnership where *Streptococcus* promotes fungal growth by secreting



metabolic products that can be used as a carbon source by the yeast [50,51]. After *C. albicans* overgrowth in the infant mouth, some of the yeast cells can be transferred to the mother through breastfeeding, so that *C. albicans* could be isolated from breast milk and misdiagnosed as the cause of mastitis.

On the other hand, nipple cracks have been significantly associated with mastitis in previous studies [1,7,13-15] under the hypothesis that it provides a portal of entry for microorganisms. However, recent studies suggested that nipple lesions can be a precocious clinical sign of mastitis rather than a predisposing factor [21]. Exfoliative or “epidermolytic” toxins are relevant virulence factors of *S. aureus* and other *Staphylococcus* species [52]. In fact, an increased milk concentration of staphylococci or streptococci had increased odds for damaged nipples [53]. Our results also revealed that the use of ointments was associated with increased incidence of mastitis, in agreement with previous studies [1,14]. Such practice may provide good environmental conditions for bacterial overgrowth and dissemination.

The use of breast pumps was associated with mastitis, although this fact may be a consequence rather than a cause, since pumping is frequently recommended to reduce breast pressure and diminish bacterial load inside the mammary ducts during mastitis [14]. Too much expression may also result in pain from breast overstretching while improper use of an electric pump can lead to mastitis, trauma, and nipple wounds [1,54].

Regarding breastfeeding characteristics and practices, the risk of developing lactational mastitis was also associated with the breast milk coming in later than 24 h postpartum. Previous studies focused on a potential relationship between positioning, attachment problems and mastitis have provided contradictory results [13,55]. The bivariate analysis showed that mastitis was less common in women that breastfed her infant immediately after birth and also in women whose infants did not have difficulties in the first latch. In fact, it has been reported that timing of the first feeding is a key determinant for establishing mother-infant interaction and breastfeeding success [56]. Other factors more frequently found in control women were feeding two children and exclusive breastfeeding *versus* mixed feeding while the opposite was detected for bottle-feeding, in agreement with other studies [1]. Exclusive breastfeeding not only avoids the use of nursing bottles, but provides better interaction between mother and infant; therefore, increasing the nursing frequency and contributing to an adequate milk drainage. Considering these facts, breastfeeding twins or tandem nursing might be also considered a protective factor for mastitis. Regarding the amount of milk produced, milk over- or undersupply *versus* normal supply was more likely reported by cases. It has been suggested

that mastitis may arise from a higher milk supply because of the risk of milk stasis if the infant delays or misses feeds [13]; this situation may provide good conditions for bacterial overgrowth. On the other hand, low milk supply could give to the mother a false perception of low milk production when, actually, only secretion is compromised due to the formation of thick bacterial biofilms inside the milk ducts [6,22,57]. This situation may also lead to longer feedings that were reported by women with mastitis.

Traditionally, interferences with suckling (pacifiers, bottle-feeding or nipple shields) have been related to breastfeeding problems and their use should be avoided, at least while the infant is learning to suckle properly. In our study, those practices were reported more frequently by women with mastitis when the initial bivariate analysis of possible risk factors was performed. In this analysis, a higher prevalence of tongue-tie (ankyloglossia) was found among infants from women with mastitis. However, this condition is not usually considered in infants without breastfeeding difficulties and, consequently, it could be underrated in the control group. The relationship between ankyloglossia and breastfeeding problems has been largely debated. Controversies in this area have arisen from attempts to find an absolute relationship between tongue-tie and breastfeeding difficulties instead of a relative one, where the first increases the risk for the latter [58]. Also, the existence of various classification systems for the diagnosis of ankyloglossia is confusing for clinicians.

Finally, mastitis was apparently associated with the lactation period, and the risk of mastitis decreased with the infant age (OR = 0.92). This could be a confounding factor because there was an age difference between cases (mean 3.35 months) and controls (mean 6.68 months) in spite of the fact that the same midwives and lactation consultants attending various health centers were in charge of recruiting cases (mastitis) and controls (healthy) women over a 21-month period. Actually, this difference in infant age due to unrestricted sampling of subjects may reflect the circumstance that lactational mastitis develops more frequently in the early stages of lactation. A higher incidence of mastitis during the first 4 weeks of breastfeeding and 75–95% of cases observed in the first 3 months has been reported previously [6]. A reduced number of the variables considered in the study could be influenced by infant's age, including jaundice, hypoglycemia or eczema symptoms; however, the frequency of these conditions did not differ between cases and controls in the initial bivariate analysis. Regarding the length of feedings, feedings longer than 45 min were more frequently reported by cases. This fact could be related with younger children in cases compared to controls since the younger is the child, the longer is the feeding, but it might also be

linked to a subclinical mastitis characterized by a decreased milk secretion that induces the baby to have longer feedings. However, taking these facts into account, this variable (feeding longer than 45 min) was excluded from the multi-variable analysis and further studies will be carried out to clarify the link between breastfeeding length and mastitis.

We must acknowledge that there are other limitations in this study. Firstly, women had a strong commitment to breastfeeding since many of them were members of breastfeeding support groups. Secondly, the data were obtained retrospectively, which leads to a reporting bias due to lack of information about some questions. And thirdly, the results must be carefully interpreted because some identified associations could be consequences of mastitis rather than its causes, which is also a limitation in the design of case-control studies. On the other hand, further studies are needed to confirm the relationship between mastitis and all the exploratory variables of this study that have not been considered in previous research findings. Additionally, the long and complex questionnaire, as well as the elapsed time from the analyses of milk samples to the questionnaire reception, accounted for the low response rate in cases (34%). In fact, this rate would have been improved if the questionnaire had been delivered and responded to by the time the breast milk samples were collected to be analyzed. This fact will be taken into account in future studies to increase the response rates.

## Conclusions

Relevant factors related to an increased risk of infectious mastitis have been identified in this study. This knowledge will allow practitioners to provide appropriate management advice about modifiable risk factors, such as the use of pumps or inappropriate medication. They also could identify those women at an increased risk of developing mastitis, such as those having a familial history of mastitis, before delivery, and thus develop strategies to prevent this condition. There are still many questions to answer about infectious mastitis, but work is in progress to broaden our knowledge in this relevant Public Health issue.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

PM assisted with the study design and data collection. LM contributed to analysis and interpretation of data. JMR originated and directed the study. LF and JMR reviewed the manuscript. MM conducted the study design, analyses and interpretation of the data and wrote the article. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

We thank all the women, midwives, lactation consultants and medical practitioners who kindly participated in this study and Ricardo García (Universidad Complutense de Madrid) for his assistance in statistical analysis of data. This work was supported by CSD2007-00063 (FUN-C-FOOD, Consolider-Ingenio 2010) and AGL2010-15420 projects from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).

Received: 8 July 2013 Accepted: 29 May 2014

Published: 6 June 2014

## References

1. Foxman B, D'Arcy H, Gillespie B, Bobo JK, Schwartz K: Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. *Am J Epidemiol* 2002, **155**:103–114.
2. Betzold CM: An update on the recognition and management of lactational breast inflammation. *J Midwifery Womens Health* 2007, **52**:595–605.
3. Scott JA, Robertson M, Fitzpatrick J, Knight C, Mulholland S: Occurrence of lactational mastitis and medical management: a prospective cohort study in Glasgow. *Int Breastfeed J* 2008, **3**:21.
4. Spencer JP: Management of mastitis in breastfeeding women. *Am Fam Physician* 2008, **78**:727–731.
5. Kvist LJ: Re-examination of old truths: replication of a study to measure the incidence of lactational mastitis in breastfeeding women. *Int Breastfeed J* 2013, **8**:2.
6. Contreras GA, Rodríguez JM: Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011, **16**:339–356.
7. Amir LH, Garland SM, Lumley J: A case-control study of mastitis: nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *BMC Fam Pr* 2006, **7**:57.
8. Amir LH, Ingram J: Health professionals' advice for breastfeeding problems: not good enough! *Int Breastfeed J* 2008, **3**:22.
9. Ip S, Chung M, Raman G, Trikalinos TA, Lau J: A summary of the Agency for Healthcare Research and Quality's evidence report on breastfeeding in developed countries. *Breastfeed Med* 2009, **4**(Suppl 1):S17–S30.
10. Dieterich CM, Felice JP, O'Sullivan E, Rasmussen KM: Breastfeeding and health outcomes for the mother-infant dyad. *Pediatr Clin North Am* 2013, **60**:31–48.
11. Geddes DT, Prescott SL: Developmental origins of health and disease the role of human milk in preventing disease in the 21st Century. *J Hum Lact* 2013, **29**:123–127.
12. World Health Organization (WHO): *Mastitis: Causes and Management*. Geneva, Switzerland: Dept. of child and adolescent health and development; 2000.
13. Vogel A, Hutchison BL, Mitchell EA: Mastitis in the first year postpartum. *Birth* 1999, **26**:218–225.
14. Kinlay JR, O'Connell DL, Kinlay S: Risk factors for mastitis in breastfeeding women: results of a prospective cohort study. *Aust N Z J Public Health* 2001, **25**:115–120.
15. Amir LH, Forster DA, Lumley J, McLachlan H: A descriptive study of mastitis in Australian breastfeeding women: incidence and determinants. *BMC Public Health* 2007, **7**:62.
16. Spanish National Institute of Statistics: *National Health Survey*; 2011. [http://www.ine.es/jaxi/tabla.do?type=pcaxis&path=/t00/mujeres\\_hombres/tablas\\_1/10/&file=d06003.px](http://www.ine.es/jaxi/tabla.do?type=pcaxis&path=/t00/mujeres_hombres/tablas_1/10/&file=d06003.px). [Interactive website; Accessed 17 June 2014].
17. *Save the Children: State of the World's Mothers*. London, UK; 2012. <http://www.savethechildren.org/atf/cf/%7B9def2ebe-10ae-432c-9bd0-df91d2eba74a%7D/STATE-OF-THE-WORLDS-MOTHERS-REPORT-2012-FINAL.PDF>. [Accessed 17 June 2014].
18. Lactation Committee of the Spanish Association of Paediatrics: *Recommendations on Breastfeeding*. Spain; 2012. [http://www.aeped.es/sites/default/files/recomendaciones\\_english.pdf](http://www.aeped.es/sites/default/files/recomendaciones_english.pdf). [Accessed 17 June 2014].
19. Arroyo R, Mediano P, Martín V, Jiménez E, Delgado S, Fernández L, Marín M, Rodríguez JM: Etiological diagnosis of infectious mastitis: proposal of a protocol for the culture of human milk samples. *Acta Paediatr Esp* 2011, **69**:276–281.
20. Prior E, Santhakumaran S, Gale C, Philipps LH, Modi N, Hyde MJ: Breastfeeding after cesarean delivery: a systematic review and meta-analysis of world literature. *Am J Clin Nutr* 2012, **95**:1113–1135.
21. Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM: Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of *Lactobacilli* isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 2010, **50**:1551–1558.
22. Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Marín ML, del Campo R, Fernández L, Rodríguez JM: *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiol* 2009, **9**:82.
23. Tanaka S, Kobayashi T, Songjiinda P, Tateyama A, Tsubouchi M, Kiyohara C, Shirakawa T, Sonomoto K, Nakayama J: Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009, **56**:80–87.

24. Camann W: Labor analgesia and breast feeding: avoid parenteral narcotics and provide lactation support. *Int J Obstet Anesth* 2007, **16**:199–201.
25. Handlin L, Jonas W, Petersson M, Ejdebäck M, Ransjö-Arvidson A-B, Nissen E, Uvnäs-Moberg K: Effects of sucking and skin-to-skin contact on maternal ACTH and cortisol levels during the second day postpartum-influence of epidural analgesia and oxytocin in the perinatal period. *Breastfeed Med* 2009, **4**:207–220.
26. Loubert C, Hinova A, Fernando R: Update on modern neuraxial analgesia in labour: a review of the literature of the last 5 years. *Anaesthesia* 2011, **66**:191–212.
27. Reddy P, Qi C, Zembower T, Noskin GA, Bolon M: Postpartum mastitis and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2007, **13**:298–301.
28. Jahanfar S, Ng CJ, Teng CL: Antibiotics for mastitis in breastfeeding women. *Cochrane Database Syst Rev* 2013, **2**, CD005458.
29. Barlow J: Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011, **16**:383–407.
30. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O: Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010, **35**:322–332.
31. Carrera M, Arroyo R, Mediano P, Fernández L, Marín M, Rodríguez JM: Breastfeeding and mastitis. Empirical treatment based on symptoms and etiological agents. *Acta Paediatr Esp* 2012, **70**:255–261.
32. Pirotta MV, Garland SM: Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. *J Clin Microbiol* 2006, **44**:3213–3217.
33. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JL, Knight R: Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009, **326**:1694–1697.
34. Lowy FD: How *Staphylococcus aureus* adapts to its host. *N Engl J Med* 2011, **364**:1987–1990.
35. Le Maréchal C, Seyffert N, Jardin J, Hernandez D, Jan G, Rault L, Azevedo V, François P, Schrenzel J, van de Guchte M, Even S, Berkova N, Thiéry R, Fitzgerald JR, Vautour E, Le Loir Y: Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS One* 2011, **6**:e27354.
36. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UME, Beck DL, Abdo Z, Fox LK, Williams JE, McGuire MK, McGuire MA: Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One* 2011, **6**:e21313.
37. Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM: The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 2013, **69**:1–10.
38. Martín R, Heilig HGHJ, Zoetendal EG, Jiménez E, Fernández L, Smidt H, Rodríguez JM: Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res Microbiol* 2007, **158**:31–37.
39. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A: The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* 2012, **96**:544–551.
40. Otto M: *Staphylococcus epidermidis*—the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2009, **7**:555–567.
41. Schoenfelder SMK, Lange C, Eckart M, Hennig S, Kozytska S, Ziebuhr W: Success through diversity - how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol* 2010, **300**:380–386.
42. Hettinga K, van Valenberg H, de Vries S, Boeren S, van Hooijdonk T, van Aarendonk J, Vervoort J: The host defense proteome of human and bovine milk. *PLoS One* 2011, **6**:e19433.
43. Chichlowski M, German JB, Lebrilla CB, Mills DA: The influence of milk oligosaccharides on microbiota of infants: opportunities for formulas. *Annu Rev Food Sci Technol* 2011, **2**:331–351.
44. Hameed KGA, Sender G, Mayntz M: Major histocompatibility complex polymorphism and mastitis resistance—a review. *Anim Sci Pap Reports* 2006, **24**:11–25.
45. Bonnefont CMD, Toufeer M, Caubet C, Foulon E, Tasca C, Aurel M-R, Bergonier D, Boullier S, Robert-Granié C, Foucras G, Rupp R: Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* 2011, **12**:208.
46. Bercot B, Kannengiesser C, Oudin C, Grandchamp B, Sanson-le Pors M-J, Mouly S, Elbm C: First description of NOD2 variant associated with defective neutrophil responses in a woman with granulomatous mastitis related to corynebacteria. *J Clin Microbiol* 2009, **47**:3034–3037.
47. Francis-Morrill J, Heinig MJ, Pappagianis D, Dewey KG: Diagnostic value of signs and symptoms of mammary candidosis among lactating women. *J Hum Lact* 2004, **20**:288–295. quiz 296–299.
48. Hale TW, Bateman TL, Finkelman MA, Berens PD: The absence of *Candida albicans* in milk samples of women with clinical symptoms of ductal candidiasis. *Breastfeed Med* 2009, **4**:57–61.
49. Scaccabarozzi L, Locatelli C, Pisoni G, Manarolla G, Casula A, Bronzo V, Moroni P: Short communication: epidemiology and genotyping of *Candida rugosa* strains responsible for persistent intramammary infections in dairy cows. *J Dairy Sci* 2011, **94**:4574–4577.
50. Shirliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA: Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2009, **299**:1–8.
51. Beaussart A, Herman P, El-Kirat-Chatel S, Lipke PN, Kucharíková S, Van Dijk P, Dufrène YF: Single-cell force spectroscopy of the medically important *Staphylococcus epidermidis*-*Candida albicans* interaction. *Nanoscale* 2013, **5**:10894–10900.
52. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G: Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel)* 2010, **2**:1148–1165.
53. Kvist LJ, Larsson BW, Hall-Lord ML, Steen A, Schälén C: The role of bacteria in lactational mastitis and some considerations of the use of antibiotic treatment. *Int Breastfeed J* 2008, **3**:6.
54. Rasmussen KM, Geraghty SR: The quiet revolution: breastfeeding transformed with the use of breast pumps. *Am J Public Health* 2011, **101**:1356–1359.
55. Goyal RC, Banginwar AS, Ziyi F, Toweer AA: Breastfeeding practices: Positioning, attachment (latch-on) and effective suckling - A hospital-based study in Libya. *J Fam Community Med* 2011, **18**:74–79.
56. Chien L-Y, Tai C-J: Effect of delivery method and timing of breastfeeding initiation on breastfeeding outcomes in Taiwan. *Birth* 2007, **34**:123–130.
57. Jiménez E, Delgado S, Arroyo R, Fernández L, Rodríguez JM: Infectious mastitis during lactation: an underrated condition (II). *Acta Paediatr Esp* 2009, **67**:125–132.
58. Kumar M, Kalke E: Tongue-tie, breastfeeding difficulties and the role of Frenotomy. *Acta Paediatr* 2012, **101**:687–689.

doi:10.1186/1471-2393-14-195

Cite this article as: Mediano et al.: Case-control study of risk factors for infectious mastitis in Spanish breastfeeding women. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2014 **14**:195.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



## ORIGINAL

# Factores de riesgo de la mastitis infecciosa en mujeres lactantes: estudio de casos y controles en población española (parte 1)\*

P. Mediano, L. Fernández, J.M. Rodríguez, M. Marín

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid

## Resumen

**Objetivo:** El objetivo de este estudio fue identificar los posibles factores de riesgo asociados a la mastitis infecciosa en mujeres lactantes.

**Métodos:** Se diseñó un estudio de casos y controles, con 368 casos (mujeres lactantes con mastitis) y 148 controles (mujeres lactantes sin mastitis). La información se recogió de forma retrospectiva mediante encuestas, que recopilaron información sobre diversos aspectos del historial médico de la madre y del hijo, así como distintos factores relacionados con el embarazo, el parto, el posparto y la lactancia que pudieran estar implicados en el desarrollo de la mastitis. La asociación entre la mastitis y dichos factores se realizó mediante un análisis bivariante y un modelo de regresión logística multivariante.

**Resultados:** Los resultados del análisis multivariante pusieron de manifiesto que los principales factores relacionados con un incremento estadísticamente significativo del riesgo de padecer mastitis fueron los siguientes: presencia de grietas en los pezones ( $p < 0,0001$ ), uso de antibióticos orales ( $p < 0,0001$ ), bombas de extracción ( $p < 0,0001$ ) y antifúngicos tópicos ( $p = 0,0009$ ) durante la lactancia, padecimiento de mastitis en lactancias previas ( $p = 0,0014$ ), subida de la leche después de 24 horas posparto ( $p = 0,0016$ ), antecedentes familiares de mastitis ( $p = 0,0028$ ), separación madre-hijo tras el parto durante más de 24 horas ( $p = 0,0027$ ), aplicación de pomadas en los pezones ( $p = 0,0228$ ) e infecciones de garganta ( $p = 0,0224$ ).

**Conclusiones:** En este trabajo se han identificado diversos factores de riesgo relacionados con el desarrollo de la mastitis infecciosa. Este conocimiento permitirá proporcionar un asesoramiento adecuado durante la lactancia sobre los factores de riesgo modificables, como el uso de bombas de extracción o de una medicación inadecuada. También se podría identificar antes del parto a las mujeres con un riesgo elevado de desarrollar mastitis, como las que presentan antecedentes familia-

## Abstract

**Title:** Case-control study of risk factors for infectious mastitis in Spanish breastfeeding women (part I)

**Introduction:** The purpose of this study was to identify potential predisposing factors associated with human infectious mastitis.

**Methods:** We conducted a case-control study among breastfeeding women, with 368 cases (women with mastitis) and 148 controls. Data were collected by a questionnaire designed to obtain retrospective information about several factors related to medical history of mother and infant, different aspects of pregnancy, delivery and postpartum, and breastfeeding practices that could be involved in mastitis. Bivariate analyses and multivariate logistic regression model were used to examine the relationship between mastitis and these factors.

**Results:** The variables significantly- and independently-associated with mastitis were cracked nipples ( $p < 0.0001$ ), oral antibiotics during breastfeeding ( $p < 0.0001$ ), breast pumps ( $p < 0.0001$ ), topical antifungal medication during breastfeeding ( $p = 0.0009$ ), mastitis in previous lactations ( $p = 0.0014$ ), breast milk coming in later than 24 h postpartum ( $p = 0.0016$ ), history of mastitis in the family ( $p = 0.0028$ ), mother-infant separation longer than 24 h ( $p = 0.0027$ ), cream on nipples ( $p = 0.0228$ ) and throat infection ( $p = 0.0224$ ).

**Conclusions:** Valuable factors related to an increased risk of infectious mastitis have been identified. This knowledge will allow practitioners to provide appropriate management advice about modifiable risk factors, such as the use of pumps or inappropriate medication. They also could identify before delivery those women at an increased risk of developing mastitis, such as those having a familial history of

Fecha de recepción: 10/09/14. Fecha de aceptación: 17/09/14.

Este manuscrito es una traducción al español del siguiente trabajo de investigación: Mediano P, Fernández L, Rodríguez JM, Marín M. Case-control study of risk factors for infectious mastitis in Spanish breastfeeding women. BMC Pregnancy Childbirth. 2014; 14(1): 195. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2393/14/195>

\*La discusión de este artículo y las referencias correspondientes se incluirán en una segunda parte que se publicará en el siguiente número de la revista (Acta Pediatr Esp. 2015; 73[2]).

**Correspondencia:** M. Marín. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid. Correo electrónico: mmarin@ucm.es



## ORIGINAL

# Factores de riesgo de la mastitis infecciosa en mujeres lactantes: estudio de casos y controles en población española (parte 2)\*

P. Mediano, L. Fernández, J.M. Rodríguez, M. Marín

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid

## Resumen

**Objetivo:** El objetivo de este estudio fue identificar los posibles factores de riesgo asociados a la mastitis infecciosa en mujeres lactantes.

**Métodos:** Se diseñó un estudio de casos y controles, con 368 casos (mujeres lactantes con mastitis) y 148 controles (mujeres lactantes sin mastitis). La información se recogió de forma retrospectiva mediante encuestas, que recopilaron información sobre diversos aspectos del historial médico de la madre y del hijo, así como distintos factores relacionados con el embarazo, el parto, el posparto y la lactancia que pudieran estar implicados en el desarrollo de la mastitis. La asociación entre la mastitis y dichos factores se realizó mediante un análisis bivariante y un modelo de regresión logística multivariante.

**Resultados:** Los resultados del análisis multivariante pusieron de manifiesto que los principales factores relacionados con un incremento estadísticamente significativo del riesgo de padecer mastitis fueron los siguientes: presencia de grietas en los pezones ( $p < 0,0001$ ), uso de antibióticos orales ( $p < 0,0001$ ), bombas de extracción ( $p < 0,0001$ ) y antifúngicos tópicos ( $p = 0,0009$ ) durante la lactancia, padecimiento de mastitis en lactancias previas ( $p = 0,0014$ ), subida de la leche después de 24 horas posparto ( $p = 0,0016$ ), antecedentes familiares de mastitis ( $p = 0,0028$ ), separación madre-hijo tras el parto durante más de 24 horas ( $p = 0,0027$ ), aplicación de pomadas en los pezones ( $p = 0,0228$ ) e infecciones de garganta ( $p = 0,0224$ ).

**Conclusiones:** En este trabajo se han identificado diversos factores de riesgo relacionados con el desarrollo de la mastitis infecciosa. Este conocimiento permitirá proporcionar un asesoramiento adecuado durante la lactancia sobre los factores de riesgo modificables, como el uso de bombas de extracción o de una medicación inadecuada. También se podría identificar antes del parto a las mujeres con un riesgo elevado de desarrollar mastitis, como las que presentan antecedentes familia-

## Abstract

**Title:** Case-control study of risk factors for infectious mastitis in Spanish breastfeeding women (part 2)

**Introduction:** The purpose of this study was to identify potential predisposing factors associated with human infectious mastitis.

**Methods:** We conducted a case-control study among breastfeeding women, with 368 cases (women with mastitis) and 148 controls. Data were collected by a questionnaire designed to obtain retrospective information about several factors related to medical history of mother and infant, different aspects of pregnancy, delivery and postpartum, and breastfeeding practices that could be involved in mastitis. Bivariate analyses and multivariate logistic regression model were used to examine the relationship between mastitis and these factors.

**Results:** The variables significantly- and independently-associated with mastitis were cracked nipples ( $p < 0.0001$ ), oral antibiotics during breastfeeding ( $p < 0.0001$ ), breast pumps ( $p < 0.0001$ ), topical antifungal medication during breastfeeding ( $p = 0.0009$ ), mastitis in previous lactations ( $p = 0.0014$ ), breast milk coming in later than 24 h postpartum ( $p = 0.0016$ ), history of mastitis in the family ( $p = 0.0028$ ), mother-infant separation longer than 24 h ( $p = 0.0027$ ), cream on nipples ( $p = 0.0228$ ) and throat infection ( $p = 0.0224$ ).

**Conclusions:** Valuable factors related to an increased risk of infectious mastitis have been identified. This knowledge will allow practitioners to provide appropriate management advice about modifiable risk factors, such as the use of pumps or inappropriate medication. They also could identify before delivery those women at an increased risk of developing mastitis, such as those having a familial history of

Fecha de recepción: 10/09/14. Fecha de aceptación: 17/09/14.

Este manuscrito es una traducción al español del siguiente trabajo de investigación: Mediano P, Fernández L, Rodríguez JM, Marín M. Case-control study of risk factors for infectious mastitis in Spanish breastfeeding women. BMC Pregnancy Childbirth. 2014; 14(1): 195. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2393/14/195>

\*La primera parte de este artículo se ha publicado en Acta Pediatr Esp. 2015; 73(1): 14-18.

**Correspondencia:** M. Marín. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria. 28040 Madrid. Correo electrónico: mmarin@ucm.es

*VI. Factores de riesgo de la mastitis infecciosa  
lactacional: árbol de decisión versus  
análisis de regresión logística*

---

*VI. Risk factors predicting infectious lactational  
mastitis: decision tree approach versus  
logistic regression analysis*

Manuscrito en revisión en  
*Maternal and Child Health Journal*



## VI.1. ABSTRACT

**Objectives:** Lactational mastitis frequently leads to a premature abandonment of breastfeeding; its development has been associated with several risk factors. This study aims to use a decision tree (DT) approach to establish the main risk factors involved in mastitis and to compare its performance for predicting this condition with a stepwise logistic regression (LR) model.

**Methods:** Data from 368 cases (breastfeeding women with mastitis) and 148 controls were collected by a questionnaire about risk factors related to medical history of mother and infant, pregnancy, delivery, postpartum, and breastfeeding practices. The performance of the DT and LR analyses was compared using the area under the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve. Sensitivity, specificity and accuracy of both models were calculated.

**Results:** Cracked nipples, antibiotics and antifungal drugs during breastfeeding, infant age, breast pumps, familial history of mastitis and throat infection were significant risk factors associated with mastitis in both analyses. Bottle-feeding and milk supply were related to mastitis for certain subgroups in the DT model. The areas under the ROC curves were similar for LR and DT models (0.870 and 0.835, respectively). The LR model had better classification accuracy and sensitivity than the DT model, but the last one presented better specificity at the optimal threshold of each curve.

**Conclusions:** The DT and LR models constitute useful and complementary analytical tools to assess the risk of lactational infectious mastitis. The DT approach identifies high-risk subpopulations that need specific mastitis prevention programs and, therefore, it could be used to make the most of Public Health resources.

**Keywords:** Lactational mastitis; risk factors; public health; decision tree; logistic regression



## **VI.2. INTRODUCTION**

Infectious mastitis constitutes a relevant problem for lactating women that frequently leads to a premature abandonment of breastfeeding, as a consequence of the pain or the inappropriate advice of a health professional [1–3]. The incidence and prevalence of this condition has been greatly underestimated because of differences in case definition and reporting [3–5]. However, in the last years infectious mastitis has received renewed attention as a relevant Public Health issue [6–10], due to the wide range of beneficial health effects that breastfeeding provides to the mother-infant pair, as well as its economic benefits [11–13]. It is important to address that an early and accurate prediction of mastitis may play a pivotal role in the diagnosis and management process and, also, in the design of strategies to prevent this condition by providing appropriate advice, especially for high-risk individuals.

In this sense, data mining is a relatively recent methodology that involves different techniques to find previously unknown patterns and trends in databases, using that information to eventually create models that enable prediction and decision making in new situations [14, 15]. Data mining includes the use of traditional and non-traditional statistical methods, such as logistic regression (LR) and decision tree (DT) analysis, respectively.

DT models are emerging as reliable and effective analytical tools that allow us to screen a large number of variables linked to a condition and to identify subgroups of individuals at higher risk as well as specific variables that index this risk. The computer generated model is represented in the form of tree structure, which provides easily interpretable and accurate predictions [16, 17]. DT models have been applied in medicine and public health for diagnosis, clinical decision-making, evaluation of treatment effectiveness and identification of risk factors for several diseases [14, 18–20].

To date, most studies searching for risk factors involved in infectious human mastitis have been focused on multiple LR models [10, 21–23] but, in contrast, a DT approach has not been used yet. Therefore, the purpose of this study was to use the DT analysis to establish the main risk factors involved in mastitis development and identify

high-risk population for mastitis outcome. Additionally, we have compared the performance of the DT and a LR model developed in a previous study [10] for predicting this condition using common risk factors. To our knowledge this is the first study using DT analysis to identify risk factors associated with infectious human mastitis.

### **VI.3. METHODS**

#### **VI.3.1. Participants**

Cases and controls data were compiled among Spanish lactating women who had participated in a previous study about risk factors for mastitis by using a bivariate analysis and a multivariate LR (stepwise) model [10]. In summary, all cases (N=368) presented symptoms of mastitis (local and/or systemic) and the diagnosis was confirmed by microbiological analysis of milk samples. Controls (N=148) were healthy breastfeeding women with no clinical symptoms of mastitis during current lactation. Informed consent to the protocol approved by the Ethical Committee of Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain) was obtained from the women involved in this study.

#### **VI.3.2. Questionnaire**

Cases and controls were asked to fill out a questionnaire designed to collect retrospective information about medical history of mother and infant, pregnancy, delivery, postpartum, and breastfeeding practices.

#### **VI.3.3. Statistical analysis**

Thirty-four out of the seventy-eight variables included in a previous bivariate analysis were statistically significant based on a  $P < 0.05$  significance level and constituted the database used in a LR model to assess the factors associated with mastitis risk [10] (Table 1). The same database, including a dichotomous version of the continuous variable age ( $< 6$  and  $\geq 6$  months of age), was used to build a DT model in order to compare the performance of both approaches to predict infectious mastitis risk.

A Chi-square Automatic Interaction Detection (CHAID) analysis was used to develop the DT. This analysis selects the variables from the database to split the sample into progressively smaller subgroups, resulting in a multilevel structure that resembles a tree. To decide which factor has the strongest association with the dependent variable at each point in the tree structure, the chi-square test is used on the basis of the minimum  $P$  value. When the CHAID algorithm identifies the most important independent variable, the node divides into two branches until the next best variable is reached. A terminal

node or leaf occurs when no remaining independent variable could yield a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) or no further split could be made due to the stopping rules previously defined [24]. In our study, as stopping rules, any node that has fewer than 20 subjects could not split and the minimum sample size for each leaf was 10 subjects.

Each terminal node could be tracked from the root node through the successive levels of the corresponding branch and it can be represented by the attributes along this pathway. For each of the nodes generated, the DT analysis computed the probabilities of the risk expressed as percentages.

#### **VI.3.4. Comparison between LR and DT models**

Receiver Operating Characteristic (ROC) curves for the DT and the LR models were plotted to evaluate the performance of each approach to predict mastitis risk by comparing the Area Under the ROC Curve (AUC) and 95% Confidence Interval (CI) for each area.

A ROC curve is a graphical illustration of sensitivity on y-axis and  $1 - \text{specificity}$  on x-axis over the entire range of possible cut-off values.

The AUC is the percentage of randomly drawn pairs for which the prediction is true and its maximum value is 1.0, thereby indicating a perfect test (100% sensitive and 100% specific). An AUC value of 0.5 indicates no discriminative value (50% sensitive and 50% specific) and it is represented by a straight, diagonal line (random chance line) extending from the lower left corner to the upper right. The larger the AUC, the better is overall performance of the model to predict mastitis risk.

Other parameters used to compare the performance between LR and DT approaches included sensitivity (fraction of positive cases classified as positive), specificity (fraction of negative cases classified as negative) and accuracy (number of cases correctly classified divided by the total number of patients) [20].

To determine these indices, the optimal cut-off from the curve was calculated by the Youden Index, i.e. the point on the ROC curve which provides the highest combination of sensitivity and specificity [25]. At this optimal threshold of ROC curve,

a confusion matrix was inferred from the statistical analysis, and sensitivity, specificity, and accuracy were calculated for each model.

The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and SAS software, version 9.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) were used for Decision Tree and Logistic Regression analyses, respectively.

## VI.4. RESULTS

### VI.4.1. CHAID Decision Tree

The DT resulting from CHAID analysis is displayed in Fig. 1. It has a depth of 4 levels from the root node and there are a total of 20 nodes including 11 terminal ones. Nine independent and significant variables were successively selected to define further branches and classify the probability of presence of mastitis: cracked nipples, antibiotic and antifungal medication during breastfeeding, infant age, use of breast pumps, familial history of mastitis, throat infection, milk supply and bottle-feeding.

The variable cracked nipples, rated by the women on a 5-point scale (from no cracked to severely cracked), was assigned by the DT algorithm as the first variable selected for splitting the root node ( $P < 0.0001$ ). It divides the population into two groups depending on the severity of the lesions ( $\leq 2$  and  $> 2$  points).

Among the women with cracked nipples rated  $\leq 2$  points, the next most significant split ( $P < 0.0001$ ) was provided by the use of antibiotics during breastfeeding. The group of women that did not take antibiotic was further differentiated by the antifungal medication during lactation ( $P < 0.0001$ ), which was used by 91.7% of women with mastitis. In the case of breastfeeding women that were neither treated with antibiotic nor antifungal therapy, a familial history of mastitis ( $P < 0.002$ ) was also correlated with mastitis risk (61.8%).

The group with cracked nipples rated  $\leq 2$  and treated with antibiotics was further divided according with the use of breast pumps ( $P = 0.005$ ). The combination of these three factors was strongly associated with a high risk of mastitis (93.3%).

Focusing on women with cracked nipples rated higher than 2 points and infants older than 6 months ( $P < 0.0001$ ), the probability of mastitis was 86.7% if the women were suffering from a throat infection ( $P = 0.02$ ).

In the group of women with cracked nipples rated  $> 2$  and infants younger than 6 months ( $P < 0.0001$ ), an oversupply of milk ( $P = 0.003$ ) was also strongly associated with mastitis (95.5%) if the women did not use pumps. The mastitis risk increased up to 98.5% in women of this group using breast pumps ( $P = 0.001$ ) and bottle-feeding their

infants ( $P = 0.0027$ ), being the highest-risk individuals in this study.

In summary, the probability of developing mastitis under the combination of the variables chosen by the DT analysis ranged from 31.9% (cracked nipples  $\leq 2$ , no antibiotics, no antifungal drugs, no familial history of mastitis) to 98.5% (cracked nipples  $> 2$ , infant age  $< 6$  months, use of pumps and bottle-feeding) (Fig. 1).

#### **VI.4.2. Comparison between LR and DT models**

The factors selected by the LR and DT approaches, as well as their  $P$ -values when these independent variables were selected in each model, are shown in Table 2. The level of each variable in the DT (as shown in Fig. 1) is also displayed in Table 2.

Seven factors were found to be relevant in both analyses to predict mastitis: cracked nipples, antibiotics and antifungal drugs during breastfeeding, infant age, breast pumps, familial history of mastitis and throat infection (Table 2). On the other hand, variables overlooked by the LR, such as bottle-feeding and milk oversupply, were important predictors of mastitis risk for certain subgroups in the DT model. Additionally, four key variables in the LR analysis, such as mastitis in previous breastfeeding, milk coming in later than 24 h after birth, separation mother-infant for longer than 24 h and cream on nipples were not identified in the DT (Table 2).

The ROC curves were calculated for both approaches (Fig. 2). Similar AUC (95% CI) values, 0.870 (0.835, 0.904) and 0.835 (0.798, 0.871), were found for LR and DT models, respectively. Therefore, both models present a good level of accuracy in predicting mastitis (AUC value  $> 0.8$ ).

The performance of LR and DT analysis for mastitis prediction was also evaluated in terms of accuracy, sensitivity and specificity parameters calculated from the confusion matrices summarized in Table 3. The confusion matrices present the detailed predictions produced from the dataset at the optimal threshold based on Youden's Index, the criterion most commonly used because it maximizes the correct classification rate and is easy to calculate. The LR model achieved a classification accuracy of 77.71% with a sensitivity of 78.26% and a specificity of 76.35% while the DT obtained a classification accuracy of 71.53% with a sensitivity of 64.70% and a specificity of

88.50% (Table 3). In conclusion, the LR model had better classification accuracy and sensitivity than the DT model, but the latter one presented a better specificity at this cut-off point of each curve.



## VI.5. DISCUSSION

DT models are playing an increasingly important role in healthcare applications that traditionally have been based on LR, being predictive modeling among the most common and relevant ones [14]. Their main advantages are simplicity and easy visualization; the results are converted to a set of decision rules similar to clinical reasoning and there is a straightforward and intuitive explanation about how the decision was made. Nevertheless, it is critical to set *a priori* stopping rules in order to avoid the DT growing into multiple levels, which could complicate its interpretation and may result in non-relevant splits. The stopping rules require defining the minimum number of individuals in the terminal nodes, the maximum number of levels the tree can grow and the minimum number of cases that any node must contain for splitting [18, 26].

DT and LR models have been evaluated according to objective and subjective criteria (accuracy, computing time taken to produce results, ease of use, and results comprehensibility) [26]. This study has addressed that both models are comparable in terms of accuracy and time to produce results, since both approaches are easy to perform with common statistical software packages. DT results are generally easier to interpret by medical staff, however, it cannot accommodate continuous variables without dichotomizing them and it has higher sample size requirement for classified subgroups.

An advantage of DT consists of its ability to describe associations in the data by revealing important interactions among variables. Accordingly, the DT model provides a way to efficiently segment populations into meaningful subgroups with clinical utility since high-risk population subgroups can be identified [17]. In contrast, LR emphasizes main effects and not interactions among variables by predicting outcomes across an entire sample. Thus, when interventions are developed from the results obtained from a LR model, they are aimed for the average member of the population, without addressing specific needs of vulnerable groups [18, 19].

Taking into account pros and cons, it is now widely accepted that DT models provide a good complement to traditional LR approaches, since both present

complementary advantages and, furthermore, relevant variables that may be overlooked by one analysis are usually selected by the other one [16]. The use of both approaches in this study has allowed us to identify those variables that better predict mastitis risk for small subgroups as well as for the overall population of breastfeeding mothers.

In the present study, both models pointed out the presence of cracked nipples as a relevant risk factor linked to mastitis, according to previous LR studies [1, 21–23]. However, to date, it has not been clarified if these lesions constitute a portal of entry of microorganisms resulting in mastitis [1, 21–23] or they are a precocious mastitis clinical sign [7]. Either way, this is a very painful condition for lactating women and its etiology and appropriate management should be carefully evaluated in further studies.

Similarly, the use of breast pumps was a relevant mastitis risk factor in both models. Their frequent and improper use may lead to breast tissue damage, soreness, and nipple wounds [27–29] and if not properly sterilized they could be a source of pathogenic bacteria [1, 27, 30]. Either as a cause of mastitis or as a consequence, since they have been recommended to prevent milk stasis [21, 31] and could be useful in case of milk oversupply, the present results reveal that their utilization is strongly associated to this condition.

The DT analysis has also shown that women with severely cracked nipples that used breast pumps and bottle-fed their infants younger than 6 months reached the highest probability of mastitis development (98.5%). In this sense, bottle-feeding and pacifiers have been strongly associated with mastitis risk by bivariate analysis [10] and their use should be avoided while the infant is learning to suckle properly [32].

The familial occurrence of mastitis was a significant risk factor in the LR analysis and it was present in the terminal node of the DT that included women with mildly cracked nipples who had not taken antibiotics or antifungal medication, suggesting that there could be a genetic predisposition for infectious mastitis whose mechanisms require further investigation.

Different factors such as antibiotic therapy may provoke a bacterial dysbiosis in the mammary gland [7, 10]. In fact, previous studies have shown that the use of antibiotics during breastfeeding is one of the most relevant risk factors for mastitis,

leading to increasing rates of antimicrobial resistance [33, 34]. The rational use of antibiotics should involve identification of the pathogen and performing an antibiogram to evaluate the most appropriate antibiotic [35, 36]. However, to date there is not a routine etiological diagnosis of mastitis by microbiological analysis. In fact, subacute and subclinical mastitis cases are frequently misdiagnosed as mammary candidiasis just on the basis of a visual evaluation of the breast [37]; as a result, an antifungal treatment is often prescribed without an improvement or even worsening of the clinical condition. Therefore, it is not surprising that among breastfeeding women with cracked nipples rated  $\leq 2$  points and without antibiotic therapy, the mastitis risk rose from 42.8% to 91.7% in the subgroup using antifungal medication. According to previous studies [21, 22] the LR analysis has also emphasized the use of creams on nipples, including antifungal ones, as a significant mastitis risk factor, since this practice may promote bacterial overgrowth and dissemination.

As this study has shown, most of the factors associated with high risk of mastitis in both models could be modified with an appropriate advice about correct breastfeeding practices, mainly avoiding the improper use of breast pumps, bottle-feeding the infant and the misuse of antibiotics, antifungal medication and nipples ointments.

On the other hand, it would be necessary to pay special attention to high-risk individuals with not-modifiable risk factors such as a history of mastitis in the family or in previous lactations or prone to recurrent throat infections, which could be identified even before delivery. This subgroup might be a good candidate for mastitis prevention or therapeutical strategies such as the use of selected probiotics during pregnancy or lactation [38].

We must acknowledge that there are some limitations in this study. Firstly, in this case-control study the data were obtained retrospectively and, therefore, there could be a reporting bias due to lack of information. Secondly, some identified associations, such as the use of breast pumps or bottle-feeding, could be either causes or consequences of mastitis, so that these results must be carefully interpreted. And thirdly, the sample size in this study could be relatively small for a classification analysis. To avoid these limitations, future studies should be focused on the analysis of prospective data with a

larger dataset. We must also acknowledge that further validation of these models in a different database is required to test the accuracy of their classifications. In this sense, work is in progress to gather new information that allows us to build a new dataset to test our models for predicting human infectious mastitis.

In summary, the decision tree and logistic regression models constitute useful and complementary analytical tools to assess the risk of lactational infectious mastitis. The use of both analyses allows us to identify those variables that predict mastitis risk for small subgroups as well as for the overall population of breastfeeding mothers. The decision tree methodology easily identifies high-risk subpopulations that would benefit from specific mastitis prevention programs and, therefore, it could be used to make the most of Public Health resources.

## VI.6. REFERENCES

1. Amir, L. H., Garland, S. M., & Lumley, J. (2006). A case-control study of mastitis: nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *BMC Family Practice*, 7, 57.
2. Amir, L. H., & Ingram, J. (2008). Health professionals' advice for breastfeeding problems: Not good enough! *International Breastfeeding Journal*, 3(1), 22.
3. Scott, J. A., Robertson, M., Fitzpatrick, J., Knight, C., & Mulholland, S. (2008). Occurrence of lactational mastitis and medical management: A prospective cohort study in Glasgow. *International Breastfeeding Journal*, 3(1), 21.
4. Spencer, J. P. (2008). Management of mastitis in breastfeeding women. *American Family Physician*, 78(6), 727-731.
5. Kvist, L. J. (2013). Re-examination of old truths: replication of a study to measure the incidence of lactational mastitis in breastfeeding women. *International Breastfeeding Journal*, 8(1), 2.
6. Delgado, S., Arroyo, R., Martín, R., & Rodríguez, J. M. (2008). PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infectious Diseases*, 8, 51.
7. Delgado, S., Arroyo, R., Jiménez, E., Marín, M. L., del Campo, R., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2009). *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiology*, 9, 82.
8. Delgado, S., García, P., Fernández, L., Jiménez, E., Rodríguez-Baños, M., del Campo, R., & Rodríguez, J. M. (2011). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 62(2), 225-235.
9. Contreras, G. A., & Rodríguez, J. M. (2011). Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 339-356.
10. Mediano, P., Fernández, L., Rodríguez, J. M., & Marín, M. (2014). Case-control study of risk factors for infectious mastitis in Spanish breastfeeding women. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 14(1), 195.
11. Renfrew, M. J., Craig, D., Dyson, L., McCormick, F., Rice, S., King, S. E., et al. (2009). Breastfeeding promotion for infants in neonatal units: a systematic review and economic analysis. *Health Technology Assessment*, 13(40), 1-146.
12. U.S. Department of Health and Human Services. (2011). The Surgeon General's Call to Action to Support Breastfeeding. Washington, DC. Available at: <http://www.surgeongeneral.gov/library/calls/breastfeeding/index.html>. Accessed 15 Nov 2014.

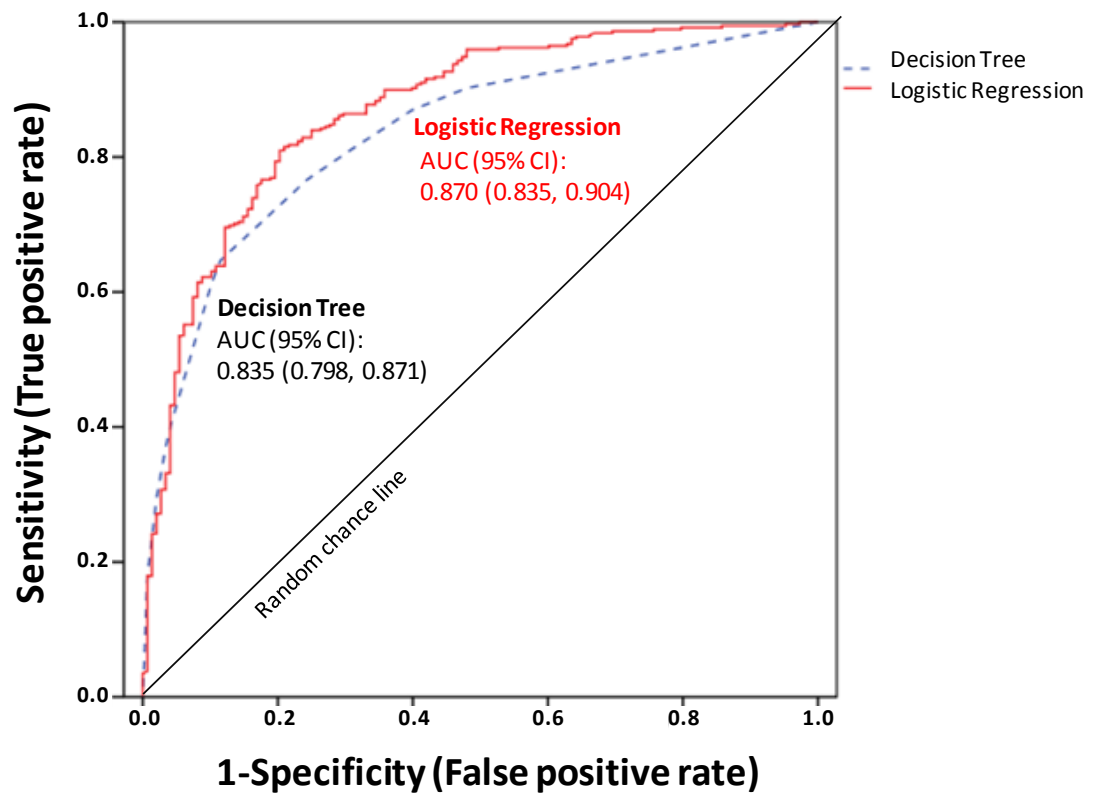
13. Eidelman, A. I., Schanler, R. J., Johnston, M., Landers, S., Noble, L., Szucs, K., & Viehmann, L. (2012). Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics*, 129(3), e827-e841.
14. Koh, H. C., & Tan, G. (2005). Data mining applications in healthcare. *Journal of Healthcare Information Management*, 19(2), 64-72.
15. Jacob, S. G., & Ramani, R. G. (2012). Data Mining in Clinical Data Sets: A Review. *International Journal of Applied Information Systems*, 4(6), 15-26.
16. Piper, M. E., Loh, W.-Y., Smith, S. S., Japuntich, S. J., & Baker, T. B. (2011). Using decision tree analysis to identify risk factors for relapse to smoking. *Substance Use & Misuse*, 46(4), 492-510.
17. Kim, T. N., Kim, J. M., Won, J. C., Park, M. S., Lee, S. K., Yoon, S. H., et al. (2012). A decision tree-based approach for identifying urban-rural differences in metabolic syndrome risk factors in the adult Korean population. *Journal of Endocrinological Investigation*, 35(9), 847-852.
18. Lemon, S. C., Roy, J., Clark, M. A., Friedmann, P. D., & Rakowski, W. (2003). Classification and regression tree analysis in public health: methodological review and comparison with logistic regression. *Annals of Behavioral Medicine*, 26(3), 172-181.
19. Batterham, P. J., Christensen, H., & Mackinnon, A. J. (2009). Modifiable risk factors predicting major depressive disorder at four year follow-up: a decision tree approach. *BMC Psychiatry*, 9(1), 75.
20. Meng, X.-H., Huang, Y.-X., Rao, D.-P., Zhang, Q., & Liu, Q. (2013). Comparison of three data mining models for predicting diabetes or prediabetes by risk factors. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 29(2), 93-99.
21. Kinlay, J. R., O'Connell, D. L., & Kinlay, S. (2001). Risk factors for mastitis in breastfeeding women: results of a prospective cohort study. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 25(2), 115-120.
22. Foxman, B., D'Arcy, H., Gillespie, B., Bobo, J. K., & Schwartz, K. (2002). Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. *American Journal of Epidemiology*, 155(2), 103-114.
23. Amir, L. H., Forster, D. A., Lumley, J., & McLachlan, H. (2007). A descriptive study of mastitis in Australian breastfeeding women: incidence and determinants. *BMC Public Health*, 7, 62.
24. Rakowski, W., & Clark, M. A. (1998). Do groups of women aged 50 to 75 match the national average mammography rate? *American Journal of Preventive Medicine*, 15(3), 187-197.
25. Kumar, R., & Indrayan, A. (2011). Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers. *Indian Pediatrics*, 48(4), 277-287.

26. Harper, P. R. (2005). A review and comparison of classification algorithms for medical decision making. *Health Policy*, 71(3), 315-331.
27. Brown, S. L., Bright, R. A., Dwyer, D. E., & Foxman, B. (2005). Breast pump adverse events: reports to the food and drug administration. *Journal of Human Lactation*, 21(2), 169-174.
28. Rasmussen, K. M., & Geraghty, S. R. (2011). The quiet revolution: breastfeeding transformed with the use of breast pumps. *American Journal of Public Health*, 101(8), 1356-1359.
29. Qi, Y., Zhang, Y., Fein, S., Wang, C., & Loyo-Berrios, N. (2014). Maternal and breast pump factors associated with breast pump problems and injuries. *Journal of Human Lactation*, 30(1), 62-72.
30. Marín, M. L., Arroyo, R., Jiménez, E., Gómez, A., Fernández, L., & Rodríguez, J. M. (2009). Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49(3), 343-348.
31. Balkam, J. J. (2010). Painful breast lumps in nursing mothers. *American Journal of Nursing*, 110(12), 65-67.
32. Lawrence, R., & Lawrence, R. M. (2008). Approach to breast-feeding. In: Duggan C., Watkins J.B., & Walker W.A. (Eds.), *Nutrition in Pediatrics: Basic Science and Clinical Applications* (4rd ed., pp. 363-37). Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc.
33. Schoenfeld, E. M., & McKay, M. P. (2010). Mastitis and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): the calm before the storm? *The Journal of Emergency Medicine*, 38(4), e31-34.
34. Holmes, M. A., & Zadoks, R. N. (2011). Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16(4), 373-382.
35. Arroyo, R., Mediano, P., Martín, V., Jiménez, E., Delgado, S., Fernández, L., et al. (2011). Etiological diagnosis of infectious mastitis: proposal of a protocol for the culture of human milk samples. *Acta Pediatrica Española*, 69(6), 276-281.
36. Carrera, M., Arroyo, R., Mediano, P., Fernández, L., Marín, M., & Rodríguez, J. M. (2012). Breastfeeding and mastitis. Empirical treatment based on symptoms and etiological agents. *Acta Pediatrica Española*, 70(6), 255-261.
37. Hale, T. W., Bateman, T. L., Finkelman, M. A., & Berens, P. D. (2009). The absence of *Candida albicans* in milk samples of women with clinical symptoms of ductal candidiasis. *Breastfeeding Medicine*, 4(2), 57-61.
38. Fernández, L., Arroyo, R., Espinosa, I., Marín, M., Jiménez, E., & Rodríguez, J. M. (2014). Probiotics for human lactational mastitis. *Beneficial Microbes*, 5(2), 169-183.





**Fig. 1** CHAID Decision Tree for predicting the risk of infectious mastitis in lactating women. Cracked nipples were rated from 1 (no cracked) to severely cracked (5). The numbers in parentheses under each of the 11 terminal nodes show the predicted probability of mastitis from the lowest [1] to the highest [11] for cases that reached the corresponding terminal node.



**Fig. 2** Receiver Operating Characteristic (ROC) curves for the Decision Tree and the Logistic Regression model. *AUC* Area under the ROC curve, *CI* Confidence Interval.

**Table 1** Factors significantly associated with mastitis risk in a previous bivariate analysis (based on a  $P < 0.05$  significance level) that were included in the Logistic Regression and Decision Tree analyses<sup>a</sup>

Variables <sup>b</sup>	OR	95% CI	P-value
Familial history of mastitis	3.20	[1.93, 5.28]	< 0.001
Mastitis in previous breastfeedings	7.13	[3.10, 16.39]	< 0.001
Urinary infection	1.77	[1.04, 3.01]	0.035
Vaginal candidiasis	1.89	[1.12, 3.17]	0.016
Throat infection	2.47	[1.47, 4.12]	< 0.001
Skin infection	2.65	[1.35, 5.18]	0.003
Anemia	2.25	[1.17, 4.32]	0.013
Thrush	3.49	[1.35, 9.02]	0.006
Breast/nipple pain during pregnancy	1.65	[1.04, 2.64]	0.034
Primiparous (vs. multiparous)	1.63	[1.10, 2.43]	0.015
Place of delivery (public hospital vs. private clinic)	0.42	[0.26, 0.68]	0.021
Cesarean section	1.70	[1.01, 2.86]	0.042
Antibiotherapy during delivery	1.53	[1.02, 2.30]	0.038
Epidural analgesia during delivery	1.90	[1.24, 2.92]	0.003
First contact with child > 60 min	2.70	[1.23, 5.90]	0.019
Separation mother-child for longer than 24 h	4.04	[1.41, 11.53]	0.009
Breastfeed after birth immediately	0.50	[0.30, 0.81]	0.005
Problems to latch on the nipple at first	2.68	[1.62, 4.44]	< 0.001
Time until the milk come in > 24 h	2.05	[1.12, 3.77]	< 0.001
Breast milk amount			0.006
Oversupply (vs. normal)	1.54	[1.01, 2.33]	
Low supply (vs. normal)	3.19	[1.39, 7.36]	
Exclusive breastfeeding	0.32	[0.18, 0.59]	< 0.001
Breastfeeding two children	0.26	[0.12, 0.55]	< 0.001
Time since breastfeeding started			
< 2 weeks	Reference		< 0.001
2-4 weeks	0.74	[0.18, 2.98]	
3-6 months	0.10	[0.03, 0.34]	
6-12 months	0.19	[0.05, 0.74]	
> 12 months	0.15	[0.04, 0.56]	
Pacifier	1.58	[1.02, 2.44]	0.040
Nipple shields	4.36	[1.95, 9.77]	< 0.001
Bottle-feeding	4.10	[2.17, 7.74]	< 0.001
Cream on nipples	3.39	[2.20, 5.24]	< 0.001
Breast pumps	3.47	[2.30, 5.22]	< 0.001
Cracked nipples (1-5) <sup>c</sup>			< 0.001
1	Reference		
2	1.70	[0.95, 3.06]	
3	4.39	[2.17, 8.91]	
4	5.04	[2.30, 11.07]	
5	7.03	[4.02, 12.01]	
Oral antibiotics during breastfeeding	4.58	[2.76, 7.60]	< 0.001
Topical antifungal medication during breastfeeding	2.67	[1.49, 4.80]	< 0.001
Analgesia during breastfeeding	1.94	[1.28, 2.96]	< 0.001
Non-steroidal anti-Inflammatory drugs	2.82	[1.79, 4.45]	< 0.001

OR odds ratio, CI confidence interval

<sup>a</sup>Adapted from Mediano et al. [10]<sup>b</sup>Continuous variable infant age was included as a dichotomous variable (< 6 and ≥ 6 months old) in the decision tree analyses.<sup>c</sup>Cracked nipples were rated from 1 (no cracked) to 5 (severely cracked).

**Table 2** Variables selected by the Logistic Regression (stepwise) and the Decision Tree CHAID models

Logistic Regression (stepwise) model		Decision Tree CHAID model		
	<i>P</i> -value		Level <sup>a</sup>	<i>P</i> -value <sup>b</sup>
Cracked nipples	< 0.0001	Cracked nipples	1	< 0.0001
Antibiotics during breastfeeding	< 0.0001	Antibiotics during breastfeeding	2	< 0.0001
Infant age	< 0.0001	Infant age	2	< 0.0001
Breast pumps	< 0.0001	Breast pumps <sup>c</sup>	3	0.001
			3	0.005
Antifungal medication during breastfeeding	0.0009	Antifungal medication during breastfeeding	3	< 0.0001
Mastitis in previous breastfeeding	0.0014	-		-
Breast milk coming in later than 24 h after birth	0.0016	-		-
Familial history of mastitis	0.0028	Familial history of mastitis	4	0.002
Separation child-mother longer than 24 h	0.0027	-		-
Cream on nipples	0.0228	-		-
Throat infection	0.0224	Throat infection	3	0.02
		Milk supply	4	0.003
		Bottle-feeding	4	0.027

<sup>a</sup>It refers to the level of the variable in the Decision Tree as shown in Fig. 1

<sup>b</sup>*P*-value of the variables selected by the Decision Tree for each split

<sup>c</sup>This variable splits two different branches of the tree as shown in Fig. 1 (*P*-value in each branch)

**Table 3** Comparison of performance parameters of the Logistic Regression (stepwise) and the Decision Tree models to predict infectious mastitis

	<i>Logistic Regression confusion matrix<sup>a</sup></i>		<i>Decision Tree confusion matrix<sup>a</sup></i>	
	<i>Predicted positives</i>	<i>Predicted negatives</i>	<i>Predicted positives</i>	<i>Predicted negatives</i>
<i>Diagnosed positives</i>	288 (TP)	80 (FN)	238 (TP)	130 (FN)
<i>Diagnosed negatives</i>	35 (FP)	113 (TN)	17 (FP)	131 (TN)

	<i>Logistic Regression</i>	<i>Decision Tree</i>
Accuracy <sup>b</sup>	77.71	71.53
Sensitivity <sup>c</sup>	78.26	64.70
Specificity <sup>d</sup>	76.35	88.50

<sup>a</sup>Confusion matrix was inferred at the optimal threshold calculated by Youden Index [max (sensitivity + specificity)]

TP = True Positive; TN = True Negative; FP = False Positive; FN = False Negative

<sup>b</sup>Accuracy = (TP + TN)/(TP + FP + TN + FN)

<sup>c</sup>Sensitivity = TP/(TP + FN)

<sup>d</sup>Specificity = TN/(TN + FP)

## *VII. Discusión general*

---



## VII. DISCUSIÓN GENERAL

La lactancia materna y la leche humana se consideran el estándar de referencia para la alimentación y la nutrición de los lactantes (*American Academy of Pediatrics-Section on Breastfeeding*, 2012). Como ya se ha mencionado en la introducción de esta Tesis Doctoral (apartado II.1.9), los beneficios asociados a la lactancia, tanto a corto como a largo plazo y en relación con numerosos aspectos médicos y del neurodesarrollo infantil, aconsejan que deba pasar de ser una elección en el estilo de vida de la madre a ser una cuestión de Salud Pública para la sociedad. En este sentido, y para fomentar, proteger y apoyar el inicio y el mantenimiento de la lactancia materna, es necesario conocer, entre otros aspectos, todos aquellos factores implicados en su manejo y soporte. Entre estos factores cabe destacar la mastitis, cuya aparición es una de las complicaciones más habituales en las madres lactantes. Sin embargo, existe un gran desconocimiento sobre esta infección, en particular sobre los agentes etiológicos implicados y los factores de riesgo. Estos dos aspectos se han abordado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral y los resultados obtenidos se analizarán con detalle a continuación.

### VII.1. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LECHE DE MUJERES CON MASTITIS

#### VII.1.1. Importancia de los cultivos de leche humana para el diagnóstico de mastitis

En contraposición con el creciente interés sobre la diversidad bacteriana de la leche de mujeres sanas (Fernández *et al.*, 2013; Jeurink *et al.*, 2013; Jost *et al.*, 2013; Jost *et al.*, 2015), el número de trabajos que abordan el estudio de la etiología de las mastitis infecciosas humanas es aún muy limitado y se desconoce el papel que juegan determinados agentes en el desarrollo de esta enfermedad. Esta situación contrasta claramente con lo que ocurre en Medicina Veterinaria, donde se reconoce la importancia de un diagnóstico etiológico preciso en las mastitis bovinas desde hace mucho tiempo debido a su impacto económico (Zadoks *et al.*, 2011; Ajitkumar *et al.*, 2012; Gurjar *et al.*, 2012; Oikonomou *et al.*, 2012; Oikonomou *et al.*, 2014).

Sorprendentemente, en los casos de mastitis humanas, no se suele proceder a la identificación del (de los) agente(s) etiológico(s) implicados mediante la realización de cultivos de leche humana, ni tampoco se estudia de forma rutinaria la sensibilidad a antimicrobianos de los agentes identificados (Amir y *Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee*, 2014; WHO, 2000). Es más, en la literatura existe cierta controversia sobre el valor que pueden tener los resultados del estudio bacteriológico de la leche en caso de mastitis lactacional. Algunos autores han sugerido que los resultados de los cultivos de leche no aportan información y que podrían ser difíciles de interpretar puesto que se encuentran las mismas especies bacterianas tanto en mujeres lactantes



sanas como en aquellas con mastitis (Kvist *et al.*, 2008). Sin embargo, otros investigadores señalan la necesidad de desarrollar protocolos de cultivo fiables en caso de dolor crónico de pecho en la mujer lactante, así como de establecer una correlación entre los hallazgos clínicos y los resultados obtenidos tras el cultivo de la leche y de la terapia aplicada (Eglash y Proctor, 2007). De hecho, recientemente se ha subrayado la utilidad de los cultivos de leche para identificar los potenciales patógenos y proporcionar el tratamiento antibiótico más adecuado, reduciendo así la duración de dicho tratamiento (Witt *et al.*, 2014a). Asimismo, una revisión sistemática sobre el análisis microbiológico de leche obtenida de mujeres lactantes con dolor agudo en el pecho, ha puesto de manifiesto la necesidad de realizar estos cultivos de leche para descubrir el agente etiológico implicado (Betzold, 2012). No obstante, la autora de esta revisión destaca importantes limitaciones a la hora de comparar estos estudios como, por ejemplo, la existencia de distintos procedimientos para la toma de muestra de leche y su cultivo, la ausencia de información disponible sobre el crecimiento y las especies de microorganismos que se encontraban en las muestras y el desconocimiento del efecto de tratamientos con antifúngicos o antibióticos antes de la obtención de la muestra.

Haciendo un análisis global de los escasos estudios disponibles en los que se presentan datos microbiológicos derivados de los cultivos de leche se puede concluir, en primer lugar, que no existen protocolos estandarizados para la recogida, el almacenamiento ni el análisis de las muestras de leche. Muy recientemente, como se ha mencionado en el apartado II.3.4.4, las instrucciones para la obtención y conservación de las muestras de leche, así como para su siembra en medios de cultivo y la interpretación de los resultados obtenidos han sido publicadas por la *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (SEIMC) en el procedimiento normalizado de trabajo titulado “*Procesamiento microbiológico de la leche materna*” (Delgado *et al.*, 2015).

Por otra parte, es relevante destacar que en la mayoría de los estudios citados no se consideró el papel de microorganismos como los estafilococos coagulasa negativos (ECN), los estreptococos del grupo *viridans* (EGV) o las corinebacterias como potenciales agentes causantes de mastitis (Eglash *et al.*, 2006; Eglash y Proctor, 2007; Witt *et al.*, 2014b), un aspecto importante a tener en cuenta cuando el procesamiento de la leche materna se lleve a cabo de forma estandarizada en los laboratorios de microbiología clínica.

### **VII.1.2. *Staphylococcus* y otros géneros relacionados**

Como se ha descrito en la introducción de este trabajo (apartado II.3.3.1), los estafilococos son los microorganismos patógenos que con mayor frecuencia están implicados en las mastitis humanas, siendo la especie *S. aureus* el principal agente etiológico de las mastitis agudas y los abscesos en el pecho, mientras que los ECN en general, y *S. epidermidis* en particular, están más relacionados con las infecciones

subagudas o subclínicas. En este sentido, el análisis del genoma completo de algunas cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* de origen humano concuerda con su implicación en infecciones agudas, en el primer caso, y crónicas, insidiosas y/o recurrentes, en el segundo (Gill *et al.*, 2005).

El hecho de que *S. epidermidis* sea considerado habitualmente una bacteria saprofita o comensal en los pocos servicios de microbiología hospitalarios en los que se analizan muestras de leche materna, ha determinado que esta especie se subestime como causa de mastitis humanas hasta la fecha. También influye en este aspecto la menor severidad de su manifestación clínica. No obstante, los ECN están emergiendo como la principal causa de mastitis en términos cuantitativos, tanto en Medicina Veterinaria como en Medicina Humana (Delgado *et al.*, 2008, Delgado *et al.*, 2009b; Contreras y Rodríguez, 2011; Fernández *et al.*, 2014).

En este trabajo, *S. epidermidis* es la especie que se aisló con mayor frecuencia (92%) en las muestras de leche de mujeres con mastitis, lo que confirma que se debe tener en consideración como un agente etiológico relevante en el desarrollo de las mastitis humanas. Esto concuerda con los resultados obtenidos previamente en otros estudios (Delgado *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009b). Sin embargo, otros investigadores han desestimado el papel de los ECN en el desarrollo de la mastitis y en el dolor persistente de la mama en la mujer lactante porque no observaron diferencias en el recuento de ECN de muestras de leche obtenidas de mujeres con mastitis y las obtenidas de controles sanos; es más, incluso se registraron recuentos más bajos de ECN en las primeras (mastitis) cuando se comparaban con las segundas (controles sanos) (Kvist *et al.*, 2008; Witt *et al.*, 2014b). Sin duda, esta especie requiere un hospedador predispuesto para transformarse de habitante comensal del cuerpo humano en agente infeccioso, lo que explicaría por qué la leche humana contiene una serie de bacterias que únicamente causan mastitis en una minoría de mujeres que, además, suelen sufrir el mismo problema de forma recurrente en lactancias sucesivas.

Para conocer con más detalle la potencial patogenicidad de los aislados de ECN es necesario hacer una identificación exacta al nivel de especie. De hecho, la gran mayoría de los datos clínicos y epidemiológicos relacionados con estos microorganismos generalmente se refieren de forma global al grupo de los ECN, y no a especies concretas. Éste es un obstáculo importante tanto para el diagnóstico de las mastitis como en los ámbitos de la epidemiología y la investigación (Savini *et al.*, 2009; Podkowic *et al.*, 2013). Cabe resaltar que, ocasionalmente, se ha demostrado que ciertos ECN, y en particular algunas cepas de *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* que habían sido aislados de casos de mastitis, tienen la capacidad de reproducir la enfermedad en un modelo experimental de ratón, lo cual confirma su papel como agentes etiológicos (Thomsen *et al.*, 1985).

Además de *S. epidermidis*, en esta Tesis Doctoral se han aislado otras cuatro

especies de ECN (*S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. pasteurii* y *S. warnerii*) a partir de muestras de leche de mujeres con mastitis. Esto confirma los resultados obtenidos en otros estudios sobre mastitis lactacionales (Delgado *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2009b). *S. lugdunensis* parece tener un carácter patógeno más marcado que otras especies de ECN (Piette y Verschraegen, 2009; Podkowic *et al.*, 2013); este microorganismo se ha asociado con infecciones de piel y tejidos blandos así como con casos de abscesos de mama en mujeres no lactantes (Sánchez *et al.*, 2001; Asnis *et al.*, 2003). Todavía se desconoce el papel de *S. pasteurii* en enfermedades humanas pero su capacidad para desarrollar mecanismos de defensa frente a múltiples fármacos está empezando a causar preocupación, tanto desde el punto de vista clínico como microbiológico (Savini *et al.*, 2009). Igualmente, *S. warnerii* y *S. hominis* tienen tendencia a desarrollar resistencia a antibióticos y pueden provocar bacteriemias relacionadas con catéteres, dado el potencial de algunos aislados para formar biopelículas o *biofilms* (Campoccia *et al.*, 2010; Arslan *et al.*, 2011; Mendoza-Olazarán *et al.*, 2013; Szczuka *et al.*, 2015).

Como se ha mencionado previamente (apartado II.3.3.1), los géneros *Rothia* y *Kocuria*, estrechamente relacionados con el género *Staphylococcus*, también podrían haber pasado desapercibidos como agentes causantes de mastitis, a pesar de que se han aislado en algunos estudios de leche de mujeres que presentaban esta patología (Delgado *et al.*, 2008; Arroyo *et al.*, 2010). *R. mucilaginosa* y *K. kristinae*, las especies pertenecientes a estos géneros que se han aislado con mayor frecuencia en esta Tesis Doctoral, han estado implicadas en bacteriemias asociadas a catéteres, como sucede en el caso de los ECN. La presencia de *biofilms* en dichos catéteres está relacionada con la elevada resistencia a antibióticos de estos microorganismos (Dunn *et al.*, 2011; Lai *et al.*, 2011; Ramanan *et al.*, 2014). Con toda seguridad, estos géneros serán objeto de mayor atención en el futuro como agentes etiológicos de la mastitis.

### **VII.1.3. *Streptococcus***

Los estreptococos son el segundo género bacteriano más importante implicado en las mastitis infecciosas humanas, en consonancia con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral. Estos microorganismos habitualmente están relacionados con los procesos subagudos y subclínicos (WHO, 2000; Delgado *et al.*, 2009a; Contreras y Rodríguez, 2011),

A pesar de que los estreptococos causantes de mastitis humanas pertenecen en su mayoría a los EGV, los estudios que han descrito el aislamiento de estos microorganismos a partir de muestras de leche de mujeres que sufren esta condición son muy escasos. Este hecho se debe a que, en general, se consideran microorganismos comensales contaminantes en las muestras clínicas y a la dificultad para la correcta identificación taxonómica de algunas especies, aspecto que se tratará con detalle en el apartado VII.2.1 de esta Tesis Doctoral.

En este trabajo, las principales especies de EGV aisladas de muestras de mastitis humanas pertenecieron a los grupos mitis (*St. mitis*, *St. oralis*, *St. parasanguinis*, *St. peroris*) y salivarius (*St. salivarius*), de acuerdo con resultados de trabajos previos (Delgado *et al.*, 2008; Arroyo *et al.*, 2010). Si bien un aislado de este trabajo se identificó como *St. pneumoniae*, también incluido en el grupo mitis, esta especie es una causa de mastitis extremadamente rara y hasta la fecha solo se han notificado tres casos en la literatura médica (Miedzybrodzki y Miller, 2013).

El análisis de la secuencia del gen 16S rRNA, método ampliamente aceptado para la identificación bacteriana, permitió la identificación de distintas especies de EGV aisladas en esta Tesis Doctoral, pero fue insuficiente para discriminar otras como *St. pneumoniae*, *St. mitis* y *St. oralis*. Es importante puntualizar que dicho análisis constituyó solamente un punto de partida para la caracterización taxonómica de los estreptococos, que se completó posteriormente con otras técnicas cuyos resultados se abordarán en el apartado VII.2.

#### VII.1.4. Corinebacterias

Como sucede en el caso de los ECN y los EGV, muchas corinebacterias constituyen también parte de la microbiota normal de la piel y de las mucosas, por lo que podría ser difícil decir si su presencia en una muestra, en nuestro caso muestras de leche, se debe a contaminación o tiene relevancia clínica. No obstante, su aislamiento en forma de cultivo puro o dominante en una muestra clínica recogida de forma higiénica muestra claramente su implicación como agente causal (Funke *et al.*, 1997).

En los últimos años, las corinebacterias están adquiriendo mucha importancia por su implicación en el desarrollo de infecciones humanas (Bernard, 2012). En relación con las mastitis, como se ha indicado en el apartado II.3.3.3, las corinebacterias se han descrito como frecuentes causantes de mastitis en rumiantes (Contreras y Rodríguez, 2011) y también están implicadas en el desarrollo de mastitis granulomatosas humanas (Paviour *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2003; Mathelin *et al.*, 2005). En este tipo de mastitis, las corinebacterias se encuentran a menudo en preparaciones histológicas de tejido mamario profundo, rodeadas por una reacción inflamatoria granulomatosa y son normalmente microorganismos exigentes que requieren medios de cultivo específicos y necesitan más de 72 h para crecer a partir de muestras clínicas (Mathelin *et al.*, 2005; Stary *et al.*, 2011), aspectos que han contribuido a subestimar la importancia de este género como causante de mastitis humanas.

La patogenia de las mastitis granulomatosas no está completamente aclarada porque ciertos factores, como alteraciones hormonales o del sistema inmune, pueden jugar un papel importante (Altintoprak *et al.*, 2014), pero diversos trabajos han mostrado que las corinebacterias son el agente etiológico de la mayor parte de las mastitis granulomatosas que anteriormente se habían considerado como de “etiología

*desconocida*” (Paviour *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2003). La especie más implicada en estos casos es, con diferencia, *C. kroppenstedti*, seguida de *C. tuberculostearicum* y *C. amycolatum* (Paviour *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2003; Bercot *et al.*, 2009). En esta Tesis Doctoral se identificaron 14 especies diferentes de corinebacterias, de las cuales las más frecuentes fueron *C. kroppenstedtii*, *C. amycolatum* y *C. tuberculostearicum*; todas estas especies han estado implicadas en mastitis granulomatosas humanas (Paviour *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2003; Bercot *et al.*, 2009). La presencia de este género también se ha descrito en otros estudios relativos a la mastitis infecciosa no granulomatosa o al dolor crónico durante la lactancia, si bien no se realizó una identificación de especie (Arroyo *et al.*, 2010; Kvist *et al.*, 2008; Witt *et al.*, 2014b).

La taxonomía de las corinebacterias ha cambiado continuamente en las últimas décadas, dificultando su identificación. Sin embargo, puesto que su relevancia como patógeno ya es manifiesta, siempre se debe realizar dicha identificación a nivel de especie (Funke *et al.*, 1997). La identificación fenotípica suele fracasar debido a la ausencia de rasgos bioquímicos específicos de especie. Sin embargo, los métodos moleculares basados en el DNA están dando buenos resultados, siendo la estrategia más utilizada la secuenciación de los genes 16S rRNA y *rpoB* (Bernard, 2012). En los últimos años, el empleo de la técnica MALDI-TOF ha surgido como la herramienta más fiable para la identificación de las especies de los géneros *Corynebacterium* y *Actinomyces* a partir de muestras clínicas (De Vreese y Verhaegen, 2013; Barberis *et al.*, 2014; Verroken *et al.*, 2014).

#### VII.1.5. Otros microorganismos

El género *Propionibacterium* se ha aislado en estudios previos de muestras de leche de mujeres con mastitis (Kvist *et al.*, 2008), en concordancia con los resultados de este estudio que describen la presencia de la especie *Propionibacterium acnes* en este tipo de muestras. Dicha especie se ha aislado previamente, junto con corinebacterias, de un caso de mastitis granulomatosa (Paviour *et al.*, 2002).

Algunas especies del género *Actinomyces* también están implicados en infecciones humanas (Valour *et al.*, 2014) y se han descrito como patógenos habituales en casos de mastitis en rumiantes (Contreras y Rodríguez, 2011). Sin embargo, hasta la fecha no se había descrito su aislamiento de muestras de leche humana con mastitis. En esta Tesis Doctoral se han encontrado seis aislados de este género, de los cuales cuatro pertenecían a la especie *Actinomyces odontolyticus*. El género *Actinomyces* tiene una notable habilidad para asociarse con otras bacterias, como por ejemplo los estreptococos, y formar *biofilms* (Palmer *et al.*, 2003). Éste es un aspecto interesante a considerar en relación con su potencial implicación en el desarrollo de mastitis.

En este trabajo también se ha puesto de manifiesto que la presencia de *Candida* spp. en muestras de leche de mujeres con mastitis es muy escasa, ya que tan

solo se pudo aislar de un 0,5% de las muestras. De hecho, las mastitis lactacionales causadas por hongos en cualquier especie de mamífero, incluida la humana, son extremadamente raras (Carmichael y Dixon, 2002; Hale *et al.*, 2009; Scaccabarozzi *et al.*, 2011).

Como se ha destacado en la introducción (apartado II.3.3.4), con mucha frecuencia los casos de mastitis en mujeres se han diagnosticado erróneamente como candidiasis mamaria solo con un examen visual del pecho, sin el aislamiento del patógeno a partir de una muestra de leche (Carmichael y Dixon, 2002; Hale *et al.*, 2009). Asimismo, en los escasos estudios en los que se ha detectado *Candida* en la leche, puede haber sido debido a la transferencia de algunas células de levaduras desde la boca del niño, ya que la mastitis por estreptococos o estafilococos promueve el desarrollo de *muguet*.

La ausencia de aislamiento de levaduras en las muestras de leche se ha atribuido al efecto inhibidor de la lactoferrina (Francis-Morrill *et al.*, 2004; Viejo-Díaz *et al.*, 2004), pero la adición de hierro al medio de cultivo tampoco parece mejorar las tasas de aislamiento (Andrews *et al.*, 2007). No obstante, las levaduras son microorganismos que crecen con facilidad, incluso en medios selectivos para otros tipos de microorganismos y, de hecho, se han aislado de leche de mujeres sanas que no reportaban ningún dolor (Carmichael y Dixon, 2002; Hale *et al.*, 2009).

El papel potencial de *C. albicans* en el dolor durante la lactancia y la mastitis es objeto de controversia. En el estudio de Andrews *et al.* (2007) se encontró *C. albicans* en más mujeres lactantes con dolor que en aquellas asintomáticas, sin embargo, este microorganismo no pudo aislarse en leche ni cultivos del pezón de la mayoría (70%) de las mujeres que referían dolor. En una revisión sistemática, Betzold (2012) explora la literatura científica relativa a la etiología del dolor durante la lactancia, concluyendo que la mayoría de los casos con dolor estaban relacionados con *C. albicans*, si bien la autora destacó importantes errores metodológicos en los estudios analizados (apartado VII.1.1). Recientemente, Amir *et al.* (2013) han señalado una posible conexión entre *Candida* y el dolor en el pecho o en el pezón. Sin embargo, en ese estudio fueron muy escasas las muestras de las que pudo aislarse *Candida* spp. mediante el empleo de técnicas estándar de cultivo y, como en estudios anteriores, no se tuvo en cuenta el papel que podrían jugar otros posibles candidatos en el dolor referido como, por ejemplo, los ECN o los EGV. A pesar de estos hechos, los autores continúan insistiendo sobre la asociación de *C. albicans* y el dolor durante la lactancia.

Los enterococos y las bacterias Gram-negativas, como por ejemplo las enterobacterias o *Pseudomonas* spp., raramente están implicados en casos de mastitis humana. Por lo tanto, su elevada concentración en un pequeño porcentaje de muestras podría indicar, como en el caso de las levaduras, que la muestra se ha contaminado durante su obtención, tal vez debido al uso de bombas de extracción o sacaleches, a

pesar de que se advirtió a las mujeres participantes en este estudio que no usaran este tipo de aparatos. En este sentido es preciso resaltar el potencial de transmisión de un amplio espectro de microorganismos mediante el uso de estos dispositivos si no se someten a procedimientos de esterilización adecuados (Marín *et al.*, 2009).

#### VII.1.6. Estudios metagenómicos

El empleo de técnicas clásicas de cultivo para la caracterización microbiológica de la leche tiene varias ventajas entre las que se puede señalar la facilidad para su realización en laboratorios de análisis clínicos o la posibilidad de aislar los microorganismos de interés (en nuestro caso, los agentes implicados en la mastitis) para su posterior estudio. Este tipo de técnicas, por otra parte, tiene el inconveniente de que sólo permite estudiar la fracción cultivable de los microorganismos presentes en una muestra. En cambio, las técnicas independientes de cultivo, aunque tienen ciertas limitaciones, aportan una visión algo más completa para la caracterización microbiológica de muestras biológicas porque permiten detectar el material genético de microorganismos que, de momento, no se pueden aislar ni cultivar en el laboratorio.

Un estudio reciente ha comparado muestras de leche tomadas de mujeres sanas con otras proporcionadas por mujeres aquejadas de mastitis utilizando técnicas metagenómicas (Jiménez *et al.*, 2015). Considerando el conjunto completo de muestras se encontraron secuencias genéticas de los géneros anaerobios facultativos *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Propionibacterium*, además de algunos géneros anaerobios estrictos como *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* y *Ruminococcus*, confirmando los resultados obtenidos por otros autores (Hunt *et al.*, 2011; Jost *et al.*, 2013).

Los resultados de ese estudio, por otra parte, confirmaron la existencia de notables diferencias desde el punto de vista microbiológico entre las muestras de mujeres sanas y las de mujeres con mastitis. En primer lugar, las muestras de mujeres sanas se caracterizaban por tener una notable diversidad bacteriana y bastante variabilidad interindividual en relación con las especies bacterianas detectadas. En contraposición, en las muestras obtenidas de mujeres con mastitis aguda, en las que el agente causal identificado por técnicas de cultivo era *S. aureus* (5,3-6,0 log<sub>10</sub> UFC/ml), se observó una disminución drástica de la diversidad bacteriana. Además, en estas muestras se registró un claro predominio de secuencias pertenecientes a la especie *S. aureus* (entre el 60,9% y el 67,2% de las secuencias totales). Curiosamente, también se encontraron en estas muestras algunas secuencias víricas relacionadas con la patogenicidad de *S. aureus* (Jiménez *et al.*, 2015). La presencia de fagos en *S. aureus* es relevante para la patogenicidad de los aislados de esta especie porque contribuyen a la adaptación de la bacteria a diversos ambientes, especialmente a los inhóspitos. Esto se explica porque el genoma de estos virus puede contener genes que codifican algunos factores de virulencia de *S. aureus*, como los responsables de la síntesis de una gran variedad de

toxinas o de mecanismos para evadir el sistema inmunológico del hospedador (Deghorain y Van Melderren, 2012).

Continuando con ese estudio metagenómico, en las muestras obtenidas de mujeres con mastitis subaguda, donde la especie identificada como agente causal fue *S. epidermidis* (5,0-6,0 log<sub>10</sub> UFC/ml), la disminución de la diversidad bacteriana fue menos notoria que lo observado con *S. aureus*. En estas muestras de mastitis subaguda, las secuencias pertenecientes a la clase *Bacilli* (10-35% del total de secuencias) aumentaron con respecto a lo registrado en las muestras de mujeres sanas (0,2-4,3% del total), pero no tanto como en las muestras de mastitis aguda (69-74% del total). Más concretamente, las secuencias del género *Staphylococcus* representaron entre el 8,3% y el 23,6% de las totales obtenidas en las muestras de mastitis subaguda, y la especie *S. epidermidis* entre el 7,6% y el 21,5% (Jiménez *et al.*, 2015).

Por otra parte, este abordaje ha revelado la gran complejidad del metagenoma de la leche humana, en el que se incluye el genoma de células humanas epiteliales y del sistema inmunológico, así como el genoma de arqueas, hongos y protozoos, además del de bacterias y virus, ya mencionados. Es importante destacar que en ninguna de las 20 muestras de leche analizadas se registró la presencia de secuencias relacionadas con el género *Candida*, ni pudo aislarse este microorganismo utilizando técnicas de cultivo (Jiménez *et al.*, 2015). Por lo tanto, y a pesar de que el diagnóstico de algunas de las mujeres participantes en el estudio había sido el de candidiasis mamaria o mastitis fúngica, se confirma la ausencia de relación entre *Candida* spp. y la mastitis, como se ha señalado anteriormente (apartado VII.1.5).

#### VII.1.7. Posibles relaciones entre los miembros de la microbiota de la leche

Por último, debe señalarse que se ha demostrado que la comunidad microbiana de la leche humana es muy compleja (Hunt *et al.*, 2011; Jeurink *et al.*, 2013; Jost *et al.*, 2013; Jost *et al.*, 2015) y que existen diversos tipos de relaciones entre sus miembros, bien antagonistas, cooperativas o neutras, que afectan al equilibrio de este consorcio bacteriano. En unos casos estas relaciones pueden promover un estado de bienestar, mientras que en otros podrían inducir enfermedad, al igual que se ha descrito en otros nichos ecológicos (Faust *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, apoyan el papel que puede jugar *S. epidermidis* como patógeno oportunista, puesto que se encuentra con mucha frecuencia con otros grupos bacterianos, como por ejemplo los estreptococos (y en especial con miembros de los grupos mitis y salivarius) o con especies del género *Rothia*. En cambio, otros grupos como la especie *S. aureus* o el género *Corynebacterium* parecen establecer una fuerte relación de exclusión con otros miembros de la microbiota de la leche. Recientemente, el estudio de las interacciones bacterianas, a partir de datos de metagenómica de la leche humana obtenidos por pirosecuenciación de productos de PCR del gen 16S rRNA, ha sugerido la existencia de una relación excluyente entre *Corynebacterium* y *Staphylococcus* y otros géneros



bacterianos (Hunt *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2015).

En definitiva, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto que muchos integrantes de los grupos ECN y EGV y las corinebacterias, que generalmente se han considerado como contaminantes de las muestras biológicas analizadas en caso de sospecha de infección, pueden tener un papel relevante como agentes etiológicos de las mastitis humanas. En consecuencia, el diagnóstico adecuado de la mastitis debe emitirse sólo después de haber realizado un análisis microbiológico de la leche según procedimientos estandarizados. Además, este análisis debe identificar el(los) microorganismo(s) responsable(s) al nivel de especie así como su concentración en la muestra de leche.

## **VII.2. IDENTIFICACIÓN DE ESTREPTOCOCOS AISLADOS DE LECHE HUMANA**

### **VII.2.1. Dificultades en la identificación de los estreptococos**

La presencia de estreptococos en leche humana se puso de manifiesto ya desde los primeros estudios realizados con técnicas clásicas de cultivo para conocer la diversidad bacteriana en este fluido biológico (Heikkilä y Saris, 2003; Martín *et al.*, 2003). Más recientemente, la aplicación de técnicas moleculares independientes de cultivo para estudiar con más detalle la complejidad microbiológica de la leche humana también ha revelado la existencia de DNA perteneciente al género *Streptococcus* (Collado *et al.*, 2009; Hunt *et al.*, 2011; Jost *et al.*, 2013; Ward *et al.*, 2013). Los resultados obtenidos en estos estudios confirman, por lo tanto, que la presencia de este grupo bacteriano en la leche materna es muy habitual. De hecho, el género *Streptococcus* parece ser uno de los principales géneros del microbioma de la leche humana (Hunt *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2015).

Los estreptococos encontrados hasta el momento en la leche humana pertenecen principalmente al grupo *viridans* y, más específicamente, a los grupos mitis y salivarius. Desde hace más de una década, numerosos trabajos han señalado la dificultad de clasificar e identificar correctamente las especies de estos grupos de estreptococos (Facklam, 2002; Doern y Burnham, 2010; Ikryannikova *et al.*, 2011; Teles *et al.*, 2011). En este sentido, una identificación precisa a nivel de especie de este grupo bacteriano, sería necesaria para alcanzar un mayor conocimiento sobre su patogenicidad y resistencia a antibióticos (Bruckner y Gigliotti, 2006; Doern y Burnham, 2010). Sin embargo, el empleo de las pruebas convencionales fenotípicas y bioquímicas no permite clasificar con exactitud los estreptococos del grupo *viridans* a nivel de especie (Ikryannikova *et al.*, 2011). Otros estudios han confirmado que los métodos de identificación estándar basados en pruebas fenotípicas tienen escasa sensibilidad para clasificar los miembros de este grupo a nivel de especie (Teles *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2012). Esta limitación podría estar relacionada, por un lado, con el escaso número

de propiedades bioquímicas específicas que se pueden analizar en comparación con el elevado número de especies bacterianas que abarca el grupo *viridans* y, por otro, con la ausencia de bases de datos actualizadas que incorporen las constantes reorganizaciones taxonómicas que el género *Streptococcus* ha sufrido en los últimos años (Hoshino *et al.*, 2005; Ikryannikova *et al.*, 2011; Teles *et al.*, 2011). Es más, se siguen adscribiendo nuevas especies al grupo *viridans*, como *Streptococcus lactarius*, *Streptococcus rubneri* y *Streptococcus dentisani*, que han sido descubiertas y descritas en los últimos años, y es muy probable que otras muchas sigan sin conocerse en la actualidad (Martín *et al.*, 2011; Huch *et al.*, 2013; Camelo-Castillo *et al.*, 2014).

## VII.2.2. Empleo de técnicas moleculares

Los métodos basados en las técnicas moleculares constituyen una buena alternativa para discriminar las especies del grupo *viridans*. Entre los diversos genes que se han propuesto para la identificación de especies del género *Streptococcus*, el gen 16S rRNA, cuyo uso está ampliamente aceptado para la identificación en otros muchos géneros bacterianos, y los genes *sodA* y *tuf*, fueron los seleccionados para la identificación de estreptococos de leche humana durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. De hecho, la secuenciación parcial de los genes 16S rRNA y *sodA* ya se había utilizado anteriormente para este fin en este tipo de muestras en dos estudios (Martín *et al.*, 2007; Collado *et al.*, 2009). En los citados estudios, la mayoría de los estreptococos aislados de leche humana fueron identificadas como *St. mitis*, *St. parasanguinis* y *St. salivarius*, en concordancia con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral y otros trabajos previos (Heikkilä y Saris, 2003; Jiménez *et al.*, 2008; Marín *et al.*, 2009; Jost *et al.*, 2013).

Sin embargo, en un elevado porcentaje de los estreptococos aislados de leche materna estudiados en esta Tesis Doctoral no se pudo lograr la identificación a nivel de especie. El hecho de que algunas especies del género *Streptococcus* compartan un alto grado de homología en su secuencia genómica complica la identificación mediante el empleo de técnicas basadas en el análisis de la secuencia de DNA. Por ello, aunque la secuenciación del gen 16S rRNA está ampliamente aceptada como método para la identificación de especies bacterianas, no es adecuada para discriminar algunos miembros del grupo *mitis* como *St. mitis*, *St. oralis*, *St. pneumoniae* y *St. pseudopneumoniae* (Kawamura *et al.*, 1995; Arbiq *et al.*, 2004). Se ha demostrado que, con mucha frecuencia, entre los miembros del grupo *viridans* se producen fenómenos de intercambio genético entre especies que ocasionan la adquisición de nuevos genes, entre otros cambios genéticos. Estas modificaciones invalidan los procesos de identificación basados en el análisis de la secuencia de un único gen (Hakenbeck *et al.*, 2001; Chi *et al.*, 2007; Kilian *et al.*, 2008).

La comprobación de que el uso del gen 16S rRNA, por sí solo, es insuficiente para discriminar entre algunas de las especies de estreptococos aislados de leche

materna y estudiadas en esta Tesis Doctoral, determinó que esta técnica se complementara con otras para lograr una identificación más precisa de los miembros de este género. Una de las alternativas propuestas ha sido el análisis simultáneo de la secuencia de varios genes constitutivos (*housekeeping genes*) (Bishop *et al.*, 2009). Con este fin, en esta Tesis Doctoral se han seleccionado los genes 16S rRNA, *sodA* y *tuf* porque sus secuencias parciales ya se habían utilizado anteriormente para la detección e identificación de estreptococos en muestras de leche humana (Martín *et al.*, 2007; Collado *et al.*, 2009). El análisis de las secuencias concatenadas de estos tres genes reveló que la varios de los aislados estudiados se agruparon en un grupo bien definido dentro del grupo *salivarius*, en el cual se incluían aislados que no se podían identificar correctamente mediante el análisis de una única secuencia génica, bien del gen *tuf* o del *sodA*; este grupo no incluía ninguna de las especies de referencia empleadas en el análisis.

Esta estrategia, basada en el análisis de los genes 16S rRNA, *sodA* y *tuf*, también permitió agrupar aislados que habían sido identificados mediante el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA y/o del gen *tuf* como *St. lactarius* junto con la cepa de referencia *St. lactarius* CECT7613. Estos aislados, sin embargo, no se identificaron correctamente cuando se empleó exclusivamente el gen *sodA*, que los asigna a otras especies del grupo *mitis*, como *St. peroris* o *St. parasanguinis*. Puede concluirse, por tanto, que el análisis de las secuencias concatenadas de estos tres genes en estas especies tuvo un poder de discriminación mucho mayor que el empleo de la secuencia de un único gen. En este sentido, los árboles filogenéticos construidos a partir de las secuencias concatenadas de algunos genes constitutivos, permiten identificar grupos de secuencias que se pueden relacionar con una determinada especie mediante la localización en el árbol de las especies tipo. El árbol resultante puede mostrar si una cepa se sitúa dentro de uno de los grupos de especies conocidas o dentro de un grupo de secuencias en el que no se localiza una especie conocida (y, por ello, es posible que se trate de una nueva especie) o bien es un genotipo divergente único (Bishop *et al.*, 2009).

Sin embargo, esta estrategia no fue satisfactoria para discriminar correctamente muchos de los aislados correspondientes a algunas de las especies del grupo *mitis*, probablemente debido a la elevada identidad de la secuencia de los genes analizados. Además, en los últimos años ha aumentado rápidamente el número de nuevas especies en el grupo *mitis* y podría haber un elevado número de nuevas especies de *Streptococcus* por descubrir y describir, lo que explicaría el aparente desacuerdo existente entre técnicas que emplean distintos genes constitutivos. En consecuencia, habría que aumentar el número de genes analizados para una mejor discriminación de los aislados.

### VII.2.3. Empleo de técnicas espectroscópicas

Actualmente, la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF ha emergido

como un método rápido, efectivo y barato para la identificación de microorganismos de relevancia clínica, entre los que se incluyen los estreptococos, en los laboratorios de microbiología (Friedrichs *et al.*, 2007; Stevenson *et al.*, 2010; Branda *et al.*, 2013; Schulthess *et al.*, 2013). Sin embargo, en esta Tesis Doctoral se ha comprobado que esta técnica también tiene muy poco poder de discriminación, entre ciertas especies del grupo mitis, como *St. mitis*, *St. oralis* y *St. pneumoniae*, hecho también constatado en otros estudios (Stevenson *et al.*, 2010, Schulthess *et al.*, 2013). La estrecha similitud del gen 16S rRNA en algunas especies del grupo mitis, como ya se ha comentado, podría explicar la dificultad para diferenciarlos con la técnica MALDI-TOF, ya que este método basa la identificación en el análisis del espectro de péptidos derivados de las proteínas ribosomales de las bacterias. De hecho, los perfiles espectrales de algunas de las especies de estreptococos del grupo mitis son muy similares y algunos estudios recientes han hecho hincapié en la necesidad de encontrar picos característicos en los espectros obtenidos con la tecnología MALDI-TOF que permita su diferenciación (Werno *et al.*, 2012; Ikryannikova *et al.*, 2013).

Cabe destacar que el sistema Bruker Biotyper asignó un alto porcentaje de aislados bacterianos a la especie *St. pneumoniae*, mientras que esos mismos aislados habían sido identificados como *St. mitis*/*St. oralis* al utilizar el sistema VITEK MS, en concordancia con lo descrito en otros estudios (Branda *et al.*, 2013; López Roa *et al.*, 2013). Los distintos algoritmos empleados para la identificación justifican la mayor sensibilidad del sistema VITEK MS frente al Bruker Biotyper a la hora de detectar picos específicos. Esta diferencia podría explicar la mayor capacidad de discriminación del sistema VITEK MS entre *St. pneumoniae* y otros estreptococos del grupo mitis (Kärpänoja *et al.*, 2014). Sin embargo, dicho sistema no pudo diferenciar los aislados de *St. mitis* de los de *St. oralis*. Por lo tanto, los sistemas basados en espectrometría de masas se deben mejorar para permitir la identificación de los estreptococos del grupo mitis, mediante la ampliación y mejora de las bases de datos, por un lado, y el reconocimiento de nuevos picos específicos del perfil espectral, por otro.

Por otra parte, hoy por hoy, no se puede diferenciar claramente la especie *St. pneumoniae*, de tanta relevancia por su gran potencial patogénico, de otras especies del grupo mitis, especialmente de *St. mitis* que es la más estrechamente relacionada. La afinidad de estas dos especies, *St. pneumoniae* y *St. mitis*, no solo está descrita desde un punto de vista taxonómico sino también en relación con su potencial patogénico, puesto que se ha comprobado que comparten determinantes de virulencia (Kilian *et al.*, 2008; Denapaite *et al.*, 2010; Mitchell, 2011). Por ello, es de vital importancia encontrar un método que permita una clara identificación de los estreptococos a nivel de especie para poder diferenciar la especie *St. pneumoniae* de otros miembros del grupo *viridans*. Dicha identificación es esencial, ya que la mayor presencia del *St. pneumoniae* en las bases de datos como un reconocido patógeno, podría restar importancia al papel que juegan otros estreptococos en infecciones humanas y concretamente en las mastitis.

En contraposición, todas las técnicas utilizadas en este trabajo han permitido identificar claramente las especies *St. mutans*, *St. pyogenes*, y *St. agalactiae*, relacionadas con infecciones invasivas en humanos (Krzyściak *et al.*, 2013). Estas especies de estreptococos, que también son fáciles de identificar por los métodos convencionales usados rutinariamente en laboratorios clínicos, tienen escasa presencia en la leche humana.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto que *St. salivarius*, *St. mitis*, y *St. parasanguinis* constituyen las especies predominantes de estreptococos en la microbiota de la leche humana. Todas las técnicas utilizadas, tanto el análisis de las secuencias de los genes 16S rRNA, *tuf*, y *sodA* y del árbol filogenético construido a partir de dichas secuencias concatenadas, como la espectrometría de masas MALDI-TOF, permitieron identificar sin dificultad los aislados de estreptococos que pertenecían a la especie *S. parasanguinis*, así como a otras especies de los grupos *salivarius* y *mutans*. No obstante, el poder de discriminación de estas técnicas no fue suficiente para la identificación de ciertas especies estrechamente relacionadas dentro del grupo *mitis*, en particular, *St. mitis*, *St. pneumoniae*, *St. pseudoneumoniae* y *St. oralis*. Se puede concluir que, a pesar de los grandes avances que se han producido en las técnicas para la identificación bacteriana, la caracterización taxonómica precisa de algunas especies de estreptococos todavía constituye un reto. Por lo tanto, es necesario mejorar las herramientas disponibles para la identificación y caracterización de los estreptococos presentes en la leche humana, incluyendo el estudio de sus factores de virulencia, la resistencia a antibióticos y su potencial implicación en el desarrollo de mastitis.

### **VII.3. FACTORES DE RIESGO DE LA MASTITIS INFECCIOSA EN MUJERES LACTANTES: ESTUDIO CASO-CONTROL EN POBLACIÓN ESPAÑOLA**

A pesar de que la mastitis infecciosa constituye un relevante problema de Salud Pública (WHO, 2000; Contreras y Rodríguez, 2011), resulta sorprendente que los estudios epidemiológicos acerca de esta materia sean tan escasos y la mayoría realizados hace más de una década (Vogel *et al.*, 1999; Kinlay *et al.*, 2001; Foxman *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2008; Amir *et al.*, 2006; Amir *et al.*, 2007).

En este contexto, el trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral, constituye el primer estudio epidemiológico sobre factores de riesgo implicados en la mastitis infecciosa realizado en España con una elevada muestra de mujeres lactantes [368 casos (mujeres lactantes con mastitis) y 148 controles (mujeres lactantes sin mastitis)] y un amplio número de variables independientes a analizar (78 variables), relativas a aspectos del historial médico de la madre y del hijo, así como distintos factores relacionados con el embarazo, el parto, el posparto y la lactancia. Se trata de un estudio caso-control en el que la asociación entre la mastitis y dichas variables se realizó, en

primer lugar, mediante un análisis bivalente y, posteriormente, utilizando dos modelos estadísticos multivariantes (regresión logística y árbol de decisión).

Algunos de los factores estudiados se seleccionaron a partir de la literatura científica sobre el tema (Vogel *et al.*, 1999; Kinlay *et al.*, 2001; Foxman *et al.*, 2002; Amir *et al.*, 2006; Amir *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2008) con el objetivo de corroborar su importancia en nuestra muestra de población. No obstante, uno de los principales objetivos de este trabajo fue el análisis de variables que no se habían evaluado con anterioridad en relación con la mastitis infecciosa, especialmente aquellas relacionadas con la historia médica de la madre. Estos factores podrían constituir marcadores de riesgo útiles para que los profesionales sanitarios identifiquen a aquellas madres lactantes con mayor riesgo de desarrollar esta condición y les proporcionen un asesoramiento adecuado durante el embarazo y la lactancia.

En el apartado II.4.1 de esta Tesis Doctoral se ha abordado de manera exhaustiva toda la información disponible hasta la fecha sobre aquellos factores de riesgo que pueden estar implicados en la mastitis infecciosa. Por tanto, el presente apartado de la discusión se va a centrar fundamentalmente en aquellos que fueron significativos tras el análisis multivariante, que incluyó 34 de las 42 variables que presentaron una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) en el análisis bivalente respecto al riesgo de padecer mastitis (Capítulo V-Tabla 5).

Es importante destacar que 8 variables significativas relativas a la historia médica del hijo y la lactancia se excluyeron del análisis multivariante por varias razones. En relación a la historia médica del hijo no se incluyeron las variables: 1) el sexo y el test APGAR, porque presentaron una diferencia significativa marginal; 2) el grupo sanguíneo, debido al pequeño tamaño de muestra en el grupo control; 3) la anquiloglosia (o frenillo lingual corto), ya que fue una variable subestimada en el grupo control; y 4) la hospitalización del hijo tras su nacimiento, porque en estos casos la separación madre-hijo fue más larga de 24 h y este factor estaba ya incluido como variable en el análisis. Respecto a la lactancia, las variables no incluidas fueron: 1) el número de posiciones durante el amamantamiento, porque estaba claramente ligado al dolor en mujeres con mastitis; 2) la presencia de pezones planos o invertidos, por el pequeño tamaño de muestra en el grupo control; y 3) la duración de la toma, ya que podría relacionarse con la menor edad de los niños en el grupo de casos que declararon, con mayor frecuencia que los controles, tomas con una duración superior a los 45 minutos. No obstante, es necesario tener en cuenta que esta situación también podría estar ligada a la presencia de una mastitis subclínica caracterizada por un descenso en la secreción de leche que induce al lactante a realizar tomas más largas. Considerando estos hechos, si bien esta variable (tomas con una duración superior a los 45 minutos) se excluyó del análisis multivariante, sería recomendable que se realizaran más estudios para aclarar la relación entre mastitis y duración de la toma.

Por otra parte, es posible que algunos factores de riesgo fueran ya descartados en el análisis bivariante debido a las limitaciones inherentes a cualquier estudio epidemiológico. En este sentido, sería interesante llevar a cabo nuevos estudios con una mayor muestra de población que pongan de relieve la importancia de aspectos del historial médico de la madre como las enfermedades tiroideas, posiblemente desestimadas por el análisis debido a la baja incidencia en la población del estudio. Esta condición médica, que podría estar relacionada con la evolución clínica de la mastitis, no se ha evaluado hasta la fecha y merece futuros estudios para esclarecerlo. Otro aspecto de gran interés sobre el que hay escasa información es la posible relación entre la mastitis y el cáncer de mama (Lambe *et al.*, 2009). En este sentido, un estudio reciente destaca por primera vez el vínculo entre la disbiosis de la glándula mamaria y el cáncer de mama, lo que sin duda tendrá implicaciones en el diagnóstico y el tratamiento de esta patología (Xuan *et al.*, 2014). De hecho, el vínculo entre la disbiosis y su contribución a los procesos cancerígenos ya está descrito para ciertos tipos de cáncer (Sheflin *et al.*, 2014).

### **VII.3.1. Factores de riesgo de la mastitis infecciosa en mujeres lactantes (I). Análisis bivariante y modelo multivariante de regresión logística**

#### ***VII.3.1.1. Factores relacionados con la historia clínica de la madre***

El vínculo entre la mastitis y la historia clínica de la madre previa a su desarrollo es un aspecto relevante que no se ha tenido en cuenta en estudios previos. En el presente trabajo, las *infecciones faríngeas, urinarias y de piel* fueron escogidas por el análisis bivariante como factores relacionados significativamente con la mastitis; además, las infecciones faríngeas también fueron seleccionadas para el modelo multivariante final. Los estudios sobre los ecosistemas bacterianos del cuerpo humano han revelado que cada localización corporal alberga una microbiota específica que lleva a cabo diversas funciones, pero estas comunidades están interrelacionadas y en constante intercambio (Costello *et al.*, 2009). Esta microbiota repercute de forma tan importante y duradera en nuestro organismo que se considera como un órgano esencial del cuerpo humano, cuyo desequilibrio puede conducir a diversas patologías (Muszer *et al.*, 2015). El uso excesivo de antibióticos, como tratamiento frente a las infecciones, supone una seria amenaza a la composición de la microbiota, ya que genera un proceso de disbiosis que determina la selección de bacterias resistentes que pueden extenderse a distintos hábitats, lo cual repercute de forma negativa en nuestra salud. En este sentido, no resulta sorprendente que patógenos implicados en infecciones faríngeas, urinarias o incluso de piel pudieran estar también asociados con el desarrollo de mastitis.

Según los resultados de este trabajo, las madres lactantes que tienen una *historia de mastitis en lactancias previas* son, desafortunadamente, buenas candidatas para el desarrollo de mastitis en las siguientes, de acuerdo con estudios anteriores (Kinlay *et al.*, 2001; Foxman *et al.*, 2002). De hecho, el análisis multivariante de este estudio reveló

que las mujeres con mastitis recurrentes presentan un riesgo casi cuatro veces mayor de padecer esta patología. Las causas para esta recurrencia no están completamente aclaradas y pueden intervenir factores diversos como prácticas poco adecuadas durante la lactancia o la selección de bacterias resistentes debido a un tratamiento antibiótico ineficaz en una mastitis previa (Reddy *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2009b; Delgado *et al.*, 2011; Carrera *et al.*, 2012). Por otra parte, el perfil de microorganismos que componen la microbiota de la leche materna es específico de cada hospedador (Martín *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2011) y podría haber mujeres con mayor susceptibilidad a padecer mastitis debido, precisamente, a la composición su microbiota mamaria. En este sentido debemos resaltar que la especie *S. epidermidis*, frecuente aunque infravalorada causa de mastitis, se encuentra en el límite entre el comensalismo y la patogenicidad y probablemente requiere un hospedador predispuesto para transformarse en un patógeno (Schoenfelder *et al.*, 2010; Otto, 2012; Otto, 2014). Asimismo, se está realizando una investigación muy activa sobre los oligosacáridos de la leche humana (HMO; del inglés *Human Milk Oligosaccharides*), cuyo perfil y concentración también son variables entre distintos individuos (Bode y Jantscher-Krenn, 2012; Prieto, 2012; Smilowitz *et al.*, 2013). Los HMO podrían influir sobre las comunidades bacterianas actuando como prebióticos, impidiendo la adhesión de patógenos o modulando las respuestas inmunológicas en la glándula mamaria e intervenir, por tanto, en la protección frente a la mastitis (Bode, 2012).

En este estudio, los *antecedentes familiares de mastitis* supusieron también un factor de riesgo significativo, que aumentaba al doble las posibilidades de padecer mastitis. Curiosamente, los factores genéticos no se han contemplado en estudios epidemiológicos previos en relación con la predisposición para sufrir mastitis humana y, sin duda, constituyen un área interesante de investigación todavía por explorar, que abre nuevas perspectivas en este campo. Estudios recientes han revelado la importancia de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP; del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) en los receptores de tipo Toll (TLR; del inglés *Toll-Like Receptors*) como factores predisponentes en un amplio espectro de enfermedades inflamatorias e infecciosas (Trejo de la O *et al.*, 2014; Skevaki *et al.*, 2015). Las asociaciones entre estas enfermedades y los SNP se encuentran en un estado incipiente de descubrimiento, pero sin duda nos ayudarán a afrontar enfermedades como la mastitis desde una nueva perspectiva. De hecho, en medicina veterinaria, la identificación de SNP asociados con la mastitis bovina resulta prometedora para el diseño de estrategias de control (Asaf *et al.*, 2014). Como se ha mencionado previamente, en medicina humana ya se ha descrito la primera asociación entre la mastitis granulomatosa causada por *Corynebacterium kroppenstedtii* y un SNP (Bercot *et al.*, 2009). En los próximos años es muy posible que se describan otros polimorfismos relacionados con las mastitis causadas por distintas especies de bacterias.



### **VII.3.1.2. Factores relacionados con el embarazo, el parto y el posparto**

La *antibioterapia periparto*, administrada en las cesáreas, debido la colonización materna con estreptococos del grupo B (*St. agalactiae*) o a la rotura prematura o prolongada de las membranas placentarias, aparecía como factor de riesgo significativo en el análisis bivariante, pero no fue finalmente seleccionada para el modelo multivariante de regresión logística. No obstante, nos parece un aspecto importante a destacar, ya que está emergiendo como un relevante factor de riesgo de la mastitis humana. Sorprendentemente, ninguno de los estudios epidemiológicos sobre mastitis hasta la fecha ha considerado el importante papel de este factor. En el apartado II.4.1.4 de la introducción se han abordado en detalle los motivos por los que se aplica y las consecuencias negativas que esta práctica conlleva en la salud materno-infantil.

No hemos encontrado estudios previos en los que se haya contemplado la relación entre la *separación madre-hijo* tras el nacimiento (debido a una hospitalización o cualquier otro motivo) y el riesgo de padecer mastitis, si bien este hecho fue significativamente más frecuente en el caso de las mujeres con mastitis de este estudio cuando la separación era superior a 24 h. Ciertamente, las primeras horas tras el nacimiento son cruciales para que se establezca el vínculo madre-hijo y la lactancia se inicie y progrese adecuadamente (Chien y Tai, 2007; de Araújo y Schmitz, 2007; Carberry *et al.*, 2013; Cantrill *et al.*, 2014; Forster *et al.*, 2015) y cualquier interferencia en este sentido podría suponer un factor predisponente para la mastitis. En este sentido, el documento “*Diez pasos para una lactancia materna exitosa*” (“*Ten Steps to Successful Breastfeeding*”), que establece los criterios mínimos para considerar un centro adscrito a la Iniciativa Hospital Amigo del Niño (conocida en España como Iniciativa para la Humanización de la Asistencia al Nacimiento y la Lactancia [IHAN]), ha revisado y actualizado estos criterios para incluir explícitamente entre sus recomendaciones que se asegure el contacto piel con piel de los recién nacidos con la madre (método de la madre canguro) de forma temprana, continua y prolongada, debiendo iniciarse inmediatamente tras el nacimiento (WHO/UNICEF, 2009; Nyqvist *et al.*, 2013). Este método ha reportado grandes beneficios en cuanto a la tasa, exclusividad y duración de la lactancia materna, especialmente en madres de niños prematuros (Venancio y Almeida, 2004; Charpak *et al.*, 2005). Por supuesto, el citado documento también promueve el inicio temprano de la lactancia y los esfuerzos para minimizar la separación entre la madre y el recién nacido en el hospital. Todas estas prácticas que favorecen un buen establecimiento de la lactancia materna sin duda redundarán en un menor riesgo de padecer mastitis.

### **VII.3.1.3. Factores relacionados con la lactancia**

El análisis multivariante de este estudio destacó la utilización de *bombas de extracción* como una de las prácticas vinculadas al riesgo de mastitis de forma más significativa. Es interesante mencionar que un número creciente de mujeres utilizan

bombas para extraerse la leche y, en los últimos años, esta práctica ha supuesto una auténtica revolución en el ámbito de la lactancia materna en los países industrializados (Rasmussen y Geraghty, 2011). Un estudio australiano reciente (Johns *et al.*, 2013b) señala que un 46% de madres con hijos sanos nacidos a término se extraen la leche mediante bombas en las primeras 24-48 h tras el nacimiento y el 48% de las madres primíparas han adquirido una bomba de extracción antes del nacimiento. En Estados Unidos se ha estimado que un 85% de las madres de lactantes entre 1,5 y 4,5 meses también se extraen la leche utilizando bombas (Labiner-Wolfe *et al.*, 2008).

Si bien el uso de bombas estuvo en sus inicios ligado a la extracción de leche para alimentar a niños prematuros y/o de bajo peso, en la actualidad son muchas las razones que conducen a esta práctica cada vez más común: las dificultades al inicio de la lactancia como los problemas en el agarre del niño al pecho, la preocupación de la madre relativa a una cantidad de leche insuficiente o la posibilidad de que otros miembros de la familia puedan alimentar al niño y, de este modo, prolongar la lactancia cuando la madre tiene que regresar al trabajo tras la baja materna (Binns *et al.*, 2006; Labiner-Wolfe *et al.*, 2008; Clemons y Amir, 2010; Flaherman y Lee, 2013; Johns *et al.*, 2013a). También se recomienda el uso de bombas cuando la cantidad de leche es abundante para reducir la presión y prevenir su estancamiento (Kinlay *et al.*, 2001; Balkman, 2010).

No obstante, a pesar de los beneficios que pueda suponer el uso de bombas, este hábito no está exento de riesgos. Uno de ellos está relacionado con la posible transferencia de microorganismos patógenos debido a su contaminación (Boo *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2005; Amir *et al.*, 2006; Marín *et al.*, 2009; Engür *et al.*, 2014). Los recuentos bacterianos son notablemente más altos en leche expresada con bomba que manualmente (Boo *et al.*, 2001; Marín *et al.*, 2009) y, por tanto, es necesario incidir sobre la necesidad de una escrupulosa limpieza y posterior esterilización. Por otra parte, las bombas de extracción pueden presentar problemas para la madre asociados con el excesivo estiramiento del pecho como consecuencia del incremento de la cantidad de leche, lo que produce dolor y malestar en la madre (Clemons y Amir, 2010; Rasmussen y Geraghty, 2011). Asimismo, se han asociado con mastitis, traumatismo y heridas en el pezón cuando la succión es elevada y/o se utilizan durante mucho tiempo (Foxman *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2005; Clemons y Amir, 2010; Rasmussen y Geraghty, 2011; Qi *et al.*, 2014). Dados los riesgos que puede acarrear la utilización de bombas, podemos concluir que un asesoramiento adecuado sobre su uso, cada vez más extendido, es siempre necesario y, asimismo, es importante una cuidadosa evaluación de dichos riesgos en estudios prospectivos.

La *presencia de grietas en los pezones* es un tema de gran relevancia que sobresale como factor de riesgo en todos los estudios sobre la mastitis y el dolor durante la lactancia (Kinlay *et al.*, 2001; Foxman *et al.*, 2002; Amir *et al.*, 2006; Amir *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2014; Witt *et al.*, 2014b). En todos ellos, así como en muchos

manuales y documentos sobre la lactancia materna (WHO, 2000; Eglash *et al.*, 2008), se sugiere que una técnica inadecuada de lactancia o la presencia de problemas anatómicos en el niño, como la anquiloglosia, producen un daño mecánico en el pezón que da lugar a la aparición de fisuras que pueden ser colonizadas por bacterias como *S. aureus*. En opinión de estos autores, estas fisuras en el pezón constituirían las rutas de entrada de la infección y, por tanto, un factor que predispone a la mastitis, cuya prevención reduciría el riesgo de padecer esta enfermedad (Kinlay *et al.*, 2001; Foxman *et al.*, 2002; Amir *et al.*, 2006; Amir *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2014; Witt *et al.*, 2014b). Debemos puntualizar que en un estudio caso-control como el presentado en este trabajo es difícil establecer muchas veces si un determinado factor podría ser causa o consecuencia de la enfermedad con la que se asocia. No obstante, es muy posible que estas lesiones constituyan un síntoma clínico más que un factor predisponente, ya que la capacidad epidermolítica de las especies causantes de mastitis interviene decisivamente en el proceso de erosión y formación de grietas en el pezón (Bukowski *et al.*, 2010). Para corroborar esta hipótesis sería muy interesante realizar un futuro estudio para comparar mediante técnicas como la electroforesis en campo pulsado (PFGE, del inglés *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), si las cepas responsables de mastitis son las mismas que han intervenido en el desarrollo de grietas de los pezones de las mujeres afectadas.

La aplicación en los pezones de pomadas tipo lanolina también estuvo asociada en este estudio con una mayor incidencia de mastitis, de acuerdo con trabajos anteriores (Kinlay *et al.*, 2001; Foxman *et al.*, 2002; Amir *et al.*, 2006). A pesar de ello, habitualmente su aplicación se recomienda como estrategia para aliviar el dolor (Abou-Dakn *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2013; Dennis *et al.*, 2014; Amir *et al.*, 2015). Amir *et al.* (2006) señalan que la relación entre cremas y mastitis se debe a su utilización cuando el pezón ya está dañado y sugieren que este factor probablemente sea una consecuencia. En cualquier caso, es indudable que las cremas proporcionan un ambiente propicio para el crecimiento bacteriano y en el caso de un pezón ya agrietado y colonizado por las bacterias responsables de la mastitis agravarían esta patología (Carrera *et al.*, 2012). Afortunadamente, varios autores han tomado conciencia de este problema y desaconsejan su uso (Dixon y Khan, 2011; Strong, 2011).

La creencia arraigada e injustificada de que las levaduras intervienen como agentes etiológicos en el desarrollo de la mastitis infecciosa o del dolor durante el amamantamiento (Andrews *et al.* 2007; Betzold, 2012; Amir *et al.*, 2013), ha propiciado el uso habitual de cremas antifúngicas para su tratamiento, especialmente con fluconazol o miconazol como principio activo (Amir y Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee, 2014; Amir *et al.*, 2015). Algunos autores incluso recomiendan una terapia antifúngica oral en el caso de que la tópica no tenga efecto (Barret *et al.*, 2013a). Debido a este hecho, en este trabajo y algunos estudios previos, la medicación antifúngica durante la lactancia estuvo asociada a la mastitis (Foxman *et al.*, 2002; Amir *et al.*, 2006). Indudablemente, la aplicación de estas cremas no es un factor que predispone a la mastitis, sino un problema derivado de la prescripción de un

tratamiento erróneo, que agrava esta condición, basada exclusivamente en una valoración visual y no avalada por un análisis de laboratorio que identifique el agente causal. En este contexto, es necesario señalar que las levaduras son una causa extremadamente rara de mastitis (Carmichael y Dixon, 2002; Hale *et al.*, 2009; Scaccabarozzi *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2015). En las mujeres tratadas con antifúngicos durante un tiempo prolongado sin mejoría, o incluso con empeoramiento, subyace una etiología bacteriana responsable del cuadro clínico (Carmichael y Dixon, 2002; Eglash y Proctor, 2007). En consecuencia, como se ha indicado anteriormente, el tratamiento de la mastitis siempre debe instaurarse tras un análisis microbiológico que determine el agente causal para evitar que el problema se agudice o se prolongue innecesariamente.

La *candidiasis oral o muguet* en el lactante podría estar relacionada con la mastitis infecciosa de la madre, debido a que los estreptococos y estafilococos de la leche promueven el crecimiento de levaduras en la boca del niño (Shirtliff *et al.*, 2009; Beaussart *et al.*, 2013). En este sentido, un mayor número de mujeres dentro del grupo de los casos reportaron tener lactantes con candidiasis oral respecto a los controles, siendo una variable significativa en el análisis univariante, pero no seleccionada posteriormente en el multivariante. Como se ha mencionado en el apartado II.3.3.4. de la introducción, algunas candidas de la boca del lactante con *muguet* podrían transferirse a la leche materna y dar lugar a un diagnóstico microbiológico erróneo, por lo que sería interesante en futuros estudios comparar microbiológicamente las parejas madre-hijo afectadas para corroborar la asociación entre los estreptococos/estafilococos de la madre y la candidiasis en el lactante, así como comprobar que la cepa transferida a la leche materna es idéntica a la que se encuentra en la boca del lactante.

Sin lugar a dudas, uno de los factores más relevantes asociados con la mastitis fue el uso de *antibióticos para su tratamiento*. La prescripción de antibióticos en casos de mastitis alcanza cifras alarmantes en países industrializados. En un estudio realizado en población americana por Foxman *et al.* (2002) se indica que el 86% de las mujeres con mastitis recibieron un tratamiento antibiótico sin un análisis microbiológico previo de una muestra de leche. Otros estudios realizados en Reino Unido (Scott *et al.*, 2008) y Australia (Kinlay *et al.*, 2001; Kvist *et al.*, 2008) reportan cifras de prescripción de antibióticos para mujeres con mastitis de entre el 53% y el 75%. En el presente estudio, el 43% de las mujeres lactantes con mastitis habían sido tratadas con uno o varios antibióticos durante el proceso de mastitis y un 51% (porcentaje calculado en el grupo de las múltiparas) presentaba antecedentes de mastitis en lactancias previas. Como se ha detallado en apartado II.3.5.5 esta alta tasa de recurrencia de las mastitis se debe fundamentalmente al aumento de cepas resistentes a los antibióticos, la formación de *biofilms* y la coexistencia de cepas con distinta sensibilidad a los antibióticos.

Como ya se ha mencionado a lo largo de este trabajo, el tratamiento antibiótico influye negativamente en la microbiota de la leche materna (Soto *et al.*, 2014), con

graves consecuencias para el recién nacido y la madre. En el niño, la microbiota materna es fundamental para la colonización del intestino, y en consecuencia, su alteración repercute en la función nutritiva, la protección frente a infecciones, el correcto desarrollo del sistema inmunológico e, incluso, la promoción de un adecuado desarrollo neurológico. En la madre, conduce a una disbiosis en la microbiota mamaria y en otros ecosistemas microbianos, que puede dar lugar a una mastitis, entre otras enfermedades infecciosas.

Todos estos hechos avalan la necesidad de establecer un tratamiento racional de la mastitis mediante un cultivo microbiológico de la leche materna y un antibiograma (Arroyo *et al.*, 2011; Carrera *et al.*, 2012). En la actualidad estos cultivos no se realizan de forma rutinaria, pero cada vez más estudios se están haciendo eco de esta necesidad, con el fin de evitar el uso indiscriminado de antibióticos (Eglish y Proctor, 2007; Betzold, 2012; Witt *et al.*, 2014a). En este sentido, el mencionado procedimiento acerca del “*Procesamiento microbiológico de la leche materna*” de la *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (SEIMC) (Delgado *et al.*, 2015) es de esperar que sienta las bases para que un futuro próximo el análisis de leche materna sea una práctica habitual en todos los Servicios de Microbiología de los hospitales de España.

En este estudio, la mastitis estuvo relacionada con el *periodo de lactancia*, de tal modo que el riesgo de mastitis disminuye a medida que aumenta la edad de niño ( $OR = 0,92$ ). Sin embargo, este hecho podría ser un factor de confusión en el estudio, ya que hubo una diferencia de edad significativa entre casos (3,35 meses de media) y controles (6,68 meses de media), a pesar de que los mismos médicos, enfermeras, matronas y consultoras de lactancia se encargaron de reclutar tanto a las mujeres lactantes con mastitis como a las sanas durante un periodo de aproximadamente 21 meses. El muestreo se realizó sin restricciones en ese parámetro y esta diferencia en la edad de los niños realmente refleja que la mastitis lactacional se desarrolla con mayor frecuencia en las primeras etapas de la lactancia, con un 75-95% de los casos durante los tres primeros meses (Vogel *et al.*, 1999; Amir *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta este hecho, la mayor edad de los niños en el grupo control permitió asegurar que las posibilidades de desarrollar una mastitis fueran muy reducidas. Asimismo, si bien un número escaso de las variables consideradas en este estudio podrían haber estado influidas por la edad del niño, como ictericia, hipoglucemia o eczema, la frecuencia de estas condiciones médicas no difirió entre casos y controles en el análisis bivalente y, en consecuencia, su asociación con la mastitis no fue significativa.

La asociación epidemiológica entre *anquiloglosia* y mastitis se ha establecido en esta Tesis Doctoral en el análisis bivalente (Mediano *et al.*, 2014); no obstante, esta circunstancia no se ha valorado habitualmente en niños de madres sin mastitis y puede estar, por tanto, subestimada en el grupo control. La anquiloglosia es en la actualidad un

motivo de controversia, hecho que se debe por una parte, a la dificultad para hacer una valoración objetiva de la misma, ya que las diferentes clasificaciones existentes hasta la fecha para establecer su grado de severidad crean confusión entre los profesionales sanitarios (Kumar y Kalke, 2012). Debido a ello en la actualidad se intentan establecer sistemas más objetivos, claros y simples para evaluar la severidad de la anquiloglosia y monitorizar los efectos de la frenotomía (Ingram *et al.*, 2015). Por otra parte, también es complicado determinar el impacto de esta condición sobre la lactancia y, de hecho, algunos autores señalan que el 50% de niños con anquiloglosia no experimentan problema alguno (Webb *et al.*, 2013), mientras que otros indican que tampoco se observa una mejora generalizada tras la frenotomía (Sheti *et al.*, 2013).

### **VII.3.2. Factores de riesgo de la mastitis infecciosa en mujeres lactantes (II). Comparación entre modelos multivariantes: árbol de decisión *versus* regresión logística**

El diagnóstico precoz y preciso de la mastitis infecciosa juega un papel relevante en el diseño de estrategias para prevenir esta enfermedad, proporcionando un adecuado asesoramiento, especialmente en grupos de población de alto riesgo. En este sentido, la minería de datos o *data mining* es una metodología relativamente reciente que incluye diferentes técnicas para encontrar en bases de datos complejas, con mucha información que *a priori* es difícil de interpretar, patrones y tendencias en los datos y utilizar esta información para crear modelos que permitan predecir o tomar una decisión en nuevas situaciones (Koh y Tan, 2005; Jacob y Ramani, 2012). La minería de datos incluye métodos estadísticos tradicionales como la regresión logística y otros, más modernos, como los árboles de decisión.

Los análisis de clasificación basados en los árboles de decisión están jugando un papel cada vez más relevante en aplicaciones relacionadas con la salud que tradicionalmente se habían basado en la regresión logística, siendo los modelos predictivos una de las más comunes e importantes (Koh y Tan, 2005). Asimismo, se están aplicando en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades, el proceso de toma de decisiones clínicas, la evaluación de la efectividad de los tratamientos y la identificación de factores de riesgo de enfermedades (Bachur y Harper, 2001; Gerald *et al.*, 2002; Podgorelec *et al.*, 2002; Lemon *et al.*, 2003; Vlahou *et al.*, 2003; Saegerman *et al.*, 2004; Koh y Tan, 2005; Batterham *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2013; Stivanello *et al.*, 2014).

Los árboles de decisión son modelos que están emergiendo como instrumentos analíticos fiables y eficaces que permiten hacer un examen exhaustivo de un gran número de variables ligadas a una determinada enfermedad e identificar subgrupos de individuos con alto riesgo dentro de esa población, así como variables específicas que nos permitan “indexar” este riesgo. El modelo que genera el ordenador presenta una estructura en distintos niveles que asemeja a las ramas de un árbol y proporciona

predicciones precisas que se pueden interpretar fácilmente (Piper *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012).

En este estudio se utilizó el algoritmo CHAID (del inglés, *Chi-square Automatic Interaction Detection*) para seleccionar las variables que dividen el nodo raíz (que contiene toda la muestra de población) de acuerdo con el test chi-cuadrado que presente un menor valor  $P$  en cada punto de la estructura del árbol. Es decir, cuando dicho algoritmo identifica la variable independiente de mayor relevancia (menor valor  $P$ ), el nodo se divide en dos ramas hasta llegar a la siguiente variable de interés. Los nodos terminales o nodos “hojas” se alcanzan cuando no quedan variables independientes con una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) o no se puede establecer un nuevo corte debido a los criterios de parada seleccionados previamente al análisis (Rakowski, 1998). La ruta desde el nodo raíz a cada nodo terminal se puede seguir fácilmente a lo largo de los niveles sucesivos de la rama correspondiente. Para cada nodo generado, el programa calcula una probabilidad de riesgo expresada en porcentaje, lo que permite visualizar fácilmente los subgrupos de mayor o menor riesgo de acuerdo a las variables determinadas por el algoritmo CHAID.

La simplicidad y fácil visualización e interpretación de los árboles de decisión constituyen una de sus principales ventajas. Los resultados se organizan siguiendo reglas de decisión semejantes a un razonamiento clínico y hay una explicación directa e intuitiva de cómo se realizaron estas decisiones. Por este motivo, estos resultados generalmente son más fáciles de interpretar por los profesionales sanitarios que aquellos generados con otros modelos estadísticos como la regresión logística (Trujillano *et al.*, 2008). No obstante, es crítico establecer *a priori* criterios de parada (*stopping rules*) para evitar que el árbol se despliegue en múltiples niveles que podrán complicar su interpretación y resultar en divisiones que no sean demasiado relevantes. Los criterios de parada requieren definir el número de individuos en el nodo terminal, el número máximo de niveles que el árbol puede crecer y el mínimo número de individuos que debe contener un nodo para dividirse (Lemon *et al.*, 2003; Harper, 2005).

Es importante resaltar que los modelos basados en árboles de decisión requieren transformar las variables continuas en dicotómicas para integrarlas en los datos (en nuestro estudio la edad), si bien este hecho podría suponer una pérdida de poder estadístico (Royston *et al.*, 2006). Por otra parte, la muestra de población debe ser suficientemente amplia para la clasificación de subgrupos de modo que los nodos terminales sean consistentes, aunque en ocasiones, una muestra demasiado grande podría generar un árbol complejo, con muchas ramas y reglas de decisión y se perdería la gran ventaja de la fácil interpretación de los árboles más sencillos (Peters *et al.*, 2006; Mann *et al.*, 2008). En este trabajo se empleó una muestra de 516 mujeres lactantes, que podría considerarse pequeña para un análisis de clasificación, pero el hecho de establecer 4 niveles como criterio de parada del crecimiento del árbol, supuso que la muestra de los nodos terminales fuera lo suficientemente grande para dar lugar

resultados consistentes y un árbol final fácil de interpretar.

Los análisis de regresión logística y árbol de decisión se han evaluado de acuerdo con criterios objetivos y subjetivos como la precisión o exactitud, tiempo de cálculo del ordenador para dar lugar a resultados y facilidad para su comprensión (Harper, 2005). De acuerdo con el estudio mencionado, el presente trabajo concluye que ambos modelos son comparables en relación al tiempo requerido para obtener los resultados, ya que son fáciles de llevar a cabo con los paquetes estadísticos disponibles actualmente. En términos de precisión y sensibilidad, el modelo de regresión logística resultó algo superior al árbol de decisión, pero este último presentó una especificidad mayor en el punto de corte óptimo de la curva ROC (del inglés, *Receiver Operating Characteristic*) correspondiente al índice de Youden. Dicho índice es el criterio más utilizado para comparar estos modelos estadísticos, y corresponde al punto de la curva que proporciona la mayor sensibilidad y especificidad combinadas (Kumar e Indrayan, 2011). En cuanto a la facilidad de uso y comprensión, el árbol de decisión es el modelo más adecuado, especialmente cuando el número de variables independientes es elevado. De hecho, en estos casos, Harper (2005) propone que el análisis basado en el árbol de decisión podría ser un paso previo a la regresión logística.

Sin lugar a dudas, una de las principales cualidades del árbol de decisión consiste en su habilidad para describir asociaciones entre los datos porque revela importantes interacciones entre las variables. Además, proporciona una herramienta muy útil para dividir una población en subgrupos con una utilidad clínica, ya que podemos identificar poblaciones con alto riesgo de desarrollar una enfermedad (Kim *et al.*, 2012). En nuestro caso, se trataría de las madres lactantes con alta probabilidad de desarrollar mastitis. Los resultados permiten identificar de forma gráfica el impacto de los parámetros identificados en grupos de riesgo definidos (Muller y Möckel, 2008).

Por el contrario, la regresión logística enfatiza efectos que afectan a toda la muestra de población en vez de buscar las relaciones entre variables. Por tanto, las intervenciones en Salud Pública que se desarrollarían a partir de un modelo de regresión logística se dirigen a toda la población, sin centrarse en las necesidades específicas de los grupos más vulnerables (Lemon *et al.*, 2003; Batterham *et al.*, 2009). En este sentido, dicho modelo permite ordenar las variables identificadas respecto a su significación estadística mediante los *odds ratio*, sus correspondientes intervalos de confianza y el valor *P*. Sin embargo, a partir de esta información es difícil elucidar aquellos grupos de población con las variables de mayor relevancia y estimar el impacto real de dichas variables (Muller y Möckel, 2008).

Teniendo en cuenta las ventajas e inconvenientes de estos análisis, los estudios que han utilizado ambas herramientas concluyen que el árbol de decisión y la regresión logística no son modelos excluyentes sino complementarios. Por lo tanto, el uso de las dos técnicas supone un enfoque prometedor en la difícil tarea de analizar e interpretar



amplias bases de datos en el área biomédica (Constanza y Paccaud, 2004; Harper, 2005; Muller y Möckel, 2008; Piper *et al.*, 2011). Por otra parte, es importante destacar que, normalmente, las variables relevantes que un modelo omite son seleccionadas por el otro (Piper *et al.*, 2011).

Hasta la fecha, los estudios sobre factores de riesgo de la mastitis infecciosa se han centrado exclusivamente en los modelos de regresión logística (Kinlay *et al.*, 2001; Foxman *et al.*, 2002; Amir *et al.*, 2007; Mediano *et al.*, 2014), pero este trabajo constituye el primer estudio en el que se utiliza el árbol de decisión como herramienta estadística para la búsqueda de factores de riesgo implicados en el desarrollo de mastitis e identifica subgrupos de población de alto riesgo. Esto se puede considerar como una interesante herramienta en Salud Pública para establecer programas de prevención que maximicen los recursos disponibles.

#### ***VII.3.2.1. Análisis de los grupos de mayor riesgo de sufrir mastitis infecciosa según el árbol de decisión***

En este apartado se van a resaltar dos variables seleccionadas como factores de riesgo significativas para ciertos grupos en el modelo del árbol de decisión: *la cantidad de leche y la utilización de biberones*.

Cuando se establecen relaciones entre los distintos factores que van determinando subgrupos con alto riesgo de padecer mastitis, se observa que en aquellas mujeres con grietas profundas en los pezones y lactantes menores de 6 meses, una cantidad de leche excesiva estuvo fuertemente asociada con el riesgo de mastitis (95,5%) cuando las mujeres lactantes no utilizaron bombas de extracción. El riesgo aumenta hasta 98,5% en mujeres lactantes que utilizaron bombas de extracción y biberones. Este último grupo fue el que registró la probabilidad más alta de desarrollo de mastitis en este estudio.

La *cantidad de leche* se ha contemplado como un potencial factor de riesgo de mastitis en pocos estudios epidemiológicos. En el trabajo de Vogel *et al.* (1999) una cantidad abundante de leche se asocia con el riesgo de padecer mastitis, debido a la posible retención de la misma si el lactante se retrasa o se salta alguna toma. Del mismo modo, en el estudio de Amir *et al.* (2006), el 29% de los casos presentaron una cantidad abundante de leche frente al 17% de los controles, resultando esta diferencia estadísticamente significativa ( $P = 0,007$ ). La reciente revisión del protocolo clínico sobre la mastitis elaborado por la *Academy of Breastfeeding Medicine* (Amir y *Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee*, 2014), sugiere que no hay una evidencia concluyente para la asociación entre estas variables, pero es importante en estos casos extraer la leche para evitar la retención, ya que da lugar a unas condiciones óptimas para el crecimiento bacteriano. En este sentido, conviene señalar que, aunque las bombas de extracción se han considerado un factor relacionado con mastitis, traumatismo y heridas en el pezón (Foxman *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2005; Clemons y

Amir, 2010; Rasmussen y Geraghty, 2011; Qi *et al.*, 2014), el grupo de alto riesgo determinado por el árbol de decisión (95,5%) que presentaba una cantidad de leche excesiva no utilizaba bombas.

Se ha demostrado que el *uso de biberones* tiene un impacto negativo sobre la lactancia tanto en niños prematuros como en los nacidos a término (WHO, 1998; Collins *et al.*, 2008) y, por ello, deben evitarse hasta que la lactancia esté instaurada con éxito (Nyqvist *et al.*, 2013). En el caso de que la madre requiera explícitamente utilizar biberones es necesario informarle sobre los riesgos, entre ellos el hecho de que estén asociados con la presencia de mastitis, como concluye el presente estudio y se ha descrito en trabajos previos (Foxman *et al.*, 2002). Esta asociación está, sin duda, relacionada con una menor frecuencia de las tomas durante una lactancia mixta, que impide el adecuado vaciamiento de la mama, al contrario de lo que ocurriría con una lactancia exclusiva. No obstante, la utilización de biberones, como ocurre en el caso de las bombas de extracción, también podría ser una consecuencia de la mastitis, es decir, una opción que la madre toma ante el dolor que sufre. Para esclarecer este hecho, este factor debe analizarse en futuros estudios prospectivos.

La relación entre la mastitis y el *tratamiento antifúngico* se ha tratado en el apartado VII.3.1.3, pero también es destacable su importancia en determinados grupos de riesgo que no están afectados por otros factores. En este sentido, en las mujeres lactantes con grietas leves en los pezones y que no habían recibido terapia antibiótica, la probabilidad de mastitis asciende hasta 91,7% si habían tenido tratamiento antifúngico; de hecho, este valor es uno de los más altos en este estudio. En este contexto, es necesario insistir en la necesidad de realizar un análisis microbiológico que determine el agente causal y su sensibilidad a los antibióticos, para evitar prolongar un tratamiento antifúngico absolutamente innecesario.

Finalmente, al igual que el modelo de regresión logística, el árbol de decisión también seleccionó los *antecedentes familiares de mastitis* como una variable relevante. Este factor aparece en un nodo terminal del árbol que presenta una probabilidad de mastitis del 62%. En este nodo se agrupan mujeres lactantes con grietas leves y sin terapia antibiótica ni antifúngica, sugiriendo que la predisposición genética puede ser otro factor relevante para la mastitis.

En resumen, el uso de un modelo de regresión logística y un análisis basado en el árbol de decisión ha permitido identificar las variables que predicen el riesgo de mastitis en la población general de madres lactantes de este estudio, así como en pequeños grupos que presentan una combinación de factores que incrementa dicho riesgo.

Los dos modelos estadísticos coinciden en destacar que los antecedentes familiares de mastitis, las infecciones faríngeas, las grietas en los pezones, el uso inadecuado de bombas, el tratamiento con antibióticos y antifúngicos y la edad del niño, son factores relevantes asociados al riesgo de padecer mastitis. Otros factores, como el

retraso en la subida de la leche ( $> 24$  h posparto), la separación madre-hijo tras el parto durante más de 24 h, la aplicación de pomadas en los pezones y las mastitis en lactancias previas, fueron seleccionados solamente por el modelo de regresión logística. En contraste, otros, como el uso de biberones y la cantidad de leche, fueron factores de riesgo significativos para ciertos grupos en el modelo basado en el árbol de decisión.

Es importante señalar que un asesoramiento eficaz sobre prácticas adecuadas durante el amamantamiento podría reducir el riesgo que conllevan muchos de los factores destacados como relevantes en este estudio. En este sentido, se debería evitar la aplicación de pomadas en los pezones y la utilización de biberones. Asimismo, es fundamental que el tratamiento antibiótico o antifúngico siempre se prescriba con un análisis microbiológico previo.

Por otra parte, se debe prestar especial atención a las mujeres de alto riesgo que tienen factores predisponentes, como antecedentes familiares de mastitis o mastitis en lactancias previas, a los que es posible identificar incluso antes del parto. Este grupo de alto riesgo sería un buen candidato para diseñar y aplicar estrategias de prevención frente a la mastitis como, por ejemplo, el empleo de probióticos durante el embarazo y la lactancia (Fernández *et al.*, 2014).

### VII.3.3. Fortalezas y limitaciones del estudio epidemiológico

El trabajo que se presenta en esta Tesis Doctoral constituye el primer estudio epidemiológico sobre factores de riesgo implicados en la mastitis infecciosa realizado en España con un elevado número ( $N = 516$ ) de mujeres lactantes. En este estudio se ha contemplado un gran número de variables ( $n = 78$ ) y dos modelos estadísticos multivariantes (regresión logística y árbol de decisión). Además, también es el primer estudio en el que se utiliza el análisis basado en el árbol de decisión para identificar variables que determinan grupos de población de alto riesgo de desarrollar esta enfermedad.

La principal fortaleza del estudio se debe a la definición clara y objetiva de los criterios de enfermedad que debían cumplir los casos. En este sentido, los estudios epidemiológicos realizados hasta la fecha sobre la mastitis infecciosa, incluyen una muestra de casos seleccionados exclusivamente basándose en los síntomas clínicos correspondientes a una mastitis aguda, diagnosticados por un profesional sanitario o, en algunos casos, de acuerdo con el criterio subjetivo de la propia madre emitido durante una entrevista telefónica (Vogel *et al.*, 1999; Kinlay *et al.*, 2001; Foxman *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2008; Amir *et al.*, 2007). Sin embargo, el estudio epidemiológico recogido en esta Tesis Doctoral es el primero en el que el diagnóstico de mastitis, o su ausencia, se confirmó mediante un parámetro objetivo: el análisis microbiológico de las muestras de leche materna. De este modo, la muestra de casos (mujeres lactantes con mastitis)

incluyó no sólo los episodios agudos, sino también las mastitis subagudas y subclínicas. Estas últimas son mucho menos evidentes desde el punto de vista clínico, ya que en numerosas ocasiones las mujeres sólo refieren una disminución de la secreción láctea como único síntoma.

Como en cualquier estudio epidemiológico, también es necesario señalar las limitaciones que presenta, algunas de las cuales derivan de la naturaleza del tipo de estudio (caso-control) (Molina Arias y Ochoa Sangrador, 2014; Papuzinski Aguayo y Martínez Lomakin, 2014), mientras que otras están relacionadas con la muestra de población seleccionada para el estudio.

Una de las principales limitaciones de los estudios caso-control se debe a que la información se recoge de forma retrospectiva, por lo que se puede incurrir en un sesgo de memoria. En estas circunstancias es muy posible que los casos recuerden sus antecedentes personales con mucho más detalle que los controles, al estar más sensibilizados con la enfermedad. Por otra parte, debido al diseño de este tipo de estudios, no es posible estimar las tasas de incidencia de una enfermedad. De hecho, en este caso, no hay hasta la fecha estudios que determinen la incidencia real de la mastitis infecciosa. Este dato suele ser difícil de obtener ya que, para ello, es necesario definir un tiempo para la recogida de datos y conocer de forma precisa la población en riesgo de padecer la enfermedad; en este caso, esta población estaría formada por las madres lactantes en un área concreta de estudio (Kvist, 2013).

Los profesionales sanitarios (consultoras de lactancia, enfermeras, matronas y médicos) implicados en la distribución de los cuestionarios analizados en esta Tesis Doctoral, así como las mujeres lactantes que lo cumplimentaron tenían un firme compromiso con la lactancia. La mayoría de las mujeres participantes eran miembros activos de grupos de apoyo a la lactancia y estaban muy sensibilizadas con el problema de la mastitis infecciosa. Por ello, esta población podría no ser una muestra completamente representativa de la totalidad de las mujeres lactantes españolas. No obstante, esta situación se dio tanto en los casos como en los controles, lo que indudablemente contribuye a que los grupos fueran bastante homogéneos a la hora de compararlos.

Otra de las limitaciones habituales en los estudios caso-control radica en la dificultad para establecer la secuencia temporal entre la exposición y la enfermedad, es decir, las relaciones de causalidad. En este sentido, se debe realizar una interpretación cuidadosa de los resultados, ya que algunas de las variables asociadas con un mayor riesgo de mastitis, podrían ser consecuencia de la mastitis en lugar de causa. Entre ellas se puede señalar el uso de bombas de extracción, la alimentación con biberón o la aplicación de pomadas en los pezones que, por otra parte, han sido vinculadas a la mastitis en estudios previos (Vogel *et al.*, 1999; Kindlay *et al.*, 2001; Foxman *et al.*, 2002; Amir *et al.*, 2006; Amir *et al.*, 2007). La relación entre estas variables y la

mastitis debe confirmarse en futuros estudios epidemiológicos prospectivos con una muestra de mayor tamaño, que permita obtener evidencias para apoyar o refutar estas asociaciones.

A pesar de sus limitaciones, este trabajo amplía el conocimiento sobre la mastitis infecciosa y es de esperar que tenga una notable repercusión en la práctica clínica de la comunidad médica involucrada en el cuidado de la díada madre-hijo. Ginecólogos, pediatras, médicos de familia, matronas y consultoras de lactancia juegan un relevante papel para proporcionar un asesoramiento adecuado a las madres lactantes e intentar prevenir y tratar esta enfermedad. El objetivo final es evitar un destete prematuro y, con ello, que muchas parejas madre-hijo disfruten plenamente de los beneficios que proporciona la lactancia materna.

Hasta ahora la mastitis infecciosa se había contemplado solo desde un punto de vista empírico, con ausencia de un diagnóstico preciso y con tratamientos que en ocasiones eran ineficaces, o solo parcialmente eficaces. Indudablemente, todavía quedan muchas cuestiones por responder que deberían impulsar futuros estudios científicos en diversas áreas de investigación (desde la microbiología hasta la inmunología y la neurobiología). En este sentido, el estudio del microbioma humano ha proporcionado sorpresas extraordinarias en los últimos años, siendo cada vez más evidente que el microbioma de la leche humana juega un papel primordial en la salud y las enfermedades de la glándula mamaria, incluyendo la mastitis (Urbaniak *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2013; Urbaniak *et al.*, 2014; Xuan *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2015).

## *VIII. Conclusiones*

---



Las conclusiones obtenidas en esta Tesis Doctoral son las siguientes:

**PRIMERA.** El género *Staphylococcus* es el principal grupo microbiano implicado en las mastitis humanas, siendo *Staphylococcus epidermidis* la especie que se aísla con mayor frecuencia (92%) en las muestras de leche de mujeres con mastitis; *Staphylococcus aureus* se detecta en el 30% de los casos. Los géneros *Streptococcus* y *Corynebacterium* constituyen el segundo (70%) y tercer (17%) grupo microbiano con mayor prevalencia en la leche de mujeres con mastitis, respectivamente. Asimismo, puede descartarse la implicación de las levaduras del género *Candida* en las mastitis humanas.

**SEGUNDA.** Los estafilococos coagulasa-negativos, estreptococos del grupo viridans y corinebacterias, habitualmente considerados microorganismos comensales y subestimados como causa de mastitis humanas, tienen un papel relevante como agentes etiológicos de esta patología. Este hecho avala que el análisis microbiológico de la leche, identificando los agentes causales a nivel de especie, sea el único medio posible para obtener un diagnóstico etiológico preciso y establecer un tratamiento eficaz para esta patología.

**TERCERA.** *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus parasanguinis* constituyen las especies predominantes de estreptococos en la microbiota de la leche humana.

**CUARTA.** Los estreptococos aislados de leche humana que pertenecen a la especie *Streptococcus parasanguinis*, así como a otras especies de los grupos salivarius y mutans se identifican sin dificultad con el análisis de las secuencias de los genes 16S rRNA, *tuf* y *sodA* y del árbol filogenético construido a partir de dichas secuencias concatenadas, así como con la espectrometría de masas MALDI-TOF. La caracterización taxonómica precisa de ciertas especies estrechamente relacionadas dentro del grupo mitis (en particular *St. mitis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae* y *Streptococcus oralis*) todavía constituye un reto porque el poder de discriminación de estas técnicas no es suficiente para su identificación.

**QUINTA:** Los antecedentes familiares de mastitis, las infecciones faríngeas, las grietas en los pezones, el uso inadecuado de bombas de extracción, el tratamiento con antibióticos y antifúngicos y la edad del niño son factores relevantes asociados al riesgo de padecer mastitis infecciosa, según han identificado dos modelos estadísticos multivariantes (la regresión logística *stepwise* y el árbol de decisión). La subida de la leche después de 24 h posparto, la separación madre-hijo tras el parto durante más de 24 h, la aplicación de pomadas en los pezones y las mastitis en lactancias previas son otros factores de riesgo seleccionados solamente por el modelo de regresión logística. El uso de biberones y la cantidad de leche producida, también son factores de riesgo significativos para ciertos grupos de mujeres, según el modelo basado en el árbol de decisión.



**SEXTA.** Los dos modelos estadísticos multivariantes (regresión logística *stepwise* y árbol de decisión) aplicados para identificar factores de riesgo relacionados con el desarrollo de la mastitis presentan una capacidad similar para predecir el riesgo de mastitis teniendo en cuenta el parámetro área bajo la curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). No obstante, en el punto de corte óptimo de la curva (índice de Youden), el modelo de regresión logística presenta una mayor exactitud y sensibilidad que el árbol de decisión y, este último, una mayor especificidad.

## *IX. Bibliografia*

---



- Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 6: 237ra65.
- Abou-Dakn M, Fluhr JW, Gensch M, Wöckel A (2011). Positive effect of HPA lanolin versus expressed breastmilk on painful and damaged nipples during lactation. *Skin Pharmacol Physiol* 24: 27–35.
- Adefurin A, Sammons H, Jacqz-Aigrain E, Choonara I (2011). Ciprofloxacin safety in paediatrics: a systematic review. *Arch Dis Child* 96: 874–880.
- Adékambi T, Drancourt M, Raoult D (2009). The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol* 17: 37–45.
- Aguilar Cordero MJ, Madrid Baños N, Baena García L, Mur Villar N, Guisado Barrilao R, Sánchez López AM (2015). Lactancia materna como método para prevenir alteraciones cardiovasculares en la madre y el niño. *Nutr Hosp* 31: 1936–1946.
- Ajitkumar P, Barkema HW, De Buck J (2012). Rapid identification of bovine mastitis pathogens by high-resolution melt analysis of 16S rDNA sequences. *Vet Microbiol* 155: 332–340.
- Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, Yazaji S, Vogel RF (2011). Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst Appl Microbiol* 34: 148–155.
- Allen HK, Trachsel J, Looft T, Casey TA (2014). Finding alternatives to antibiotics. *Ann N Y Acad Sci* 1323: 91–100.
- Alm B, Wennergren G, Möllborg P, Lagercrantz H (2015). Breastfeeding and dummy use have a protective effect on sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr* [doi: 10.1111/apa.13124]
- Alós Cortés JI, Andreu Domingo A, Arribas Mir L, et al (2013). Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas revisadas y actualizadas (2012). Documento consenso SEIMC/SEGO/SEN/SEQ/SEMFYC. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 31: 159–172.
- Alouf JE, Müller-Alouf H (2003). Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol* 292: 429–440.
- Altintoprak F, Kivilcim T, Ozkan OV (2014). Aetiology of idiopathic granulomatous mastitis. *World J Clin Cases* 2: 852–858.
- American Academy of Pediatrics (2011). Policy statement—Recommendations for the prevention of perinatal group B streptococcal (GBS) disease. *Pediatrics* 128: 611–616.
- American Academy of Pediatrics-Section on Breastfeeding (2012). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 129: e827–e841.
- Amir LH, Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee (2014). ABM clinical protocol #4: Mastitis, revised March 2014. *Breastfeed Med* 9: 239–243.
- Amir LH, Donath SM, Garland SM, et al (2013). Does *Candida* and/or *Staphylococcus* play a role in nipple and breast pain in lactation? A cohort study in Melbourne, Australia. *BMJ Open* 3: e002351.
- Amir LH, Forster DA, Lumley J, McLachlan H (2007). A descriptive study of mastitis in Australian breastfeeding women: incidence and determinants. *BMC Public Health* 7: 62.
- Amir LH, Forster D, McLachlan H, Lumley J (2004). Incidence of breast abscess in lactating women: report from an Australian cohort. *BJOG* 111: 1378–1381.
- Amir LH, Garland SM, Lumley J (2006). A case-control study of mastitis: nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *BMC Fam Pract* 7: 57.
- Amir LH, Ingram J (2008). Health professionals' advice for breastfeeding problems: Not good enough! *Int*

- Breastfeed J* 3: 22.
- Amir LH, Jones LE, Buck ML (2015). Nipple pain associated with breastfeeding: incorporating current neurophysiology into clinical reasoning. *Aust Fam Physician* 44: 127–132.
- Anderson JE, Held N, Wright K (2004). Raynaud's phenomenon of the nipple: a treatable cause of painful breastfeeding. *Pediatrics* 113: e360–364.
- Ando Y, Kakimoto K, Tanigawa T, *et al* (1989). Effect of freeze-thawing breast milk on vertical HTLV-I transmission from seropositive mothers to children. *Jpn J Cancer Res* 80: 405–407.
- Andreas NJ, Kampmann B, Mehning Le-Doare K (2015). Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev* 91: 629–635.
- Andreu A, Sanfeliu I, Viñas L, *et al* (2003). Declive de la incidencia de la sepsis perinatal por estreptococo del grupo B (Barcelona 1994-2001). Relación con las políticas profilácticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 21: 174–179.
- Andrews JI, Fleener DK, Messer SA, Hansen WF, Pfaller MA, Diekema DJ (2007). The yeast connection: is *Candida* linked to breastfeeding associated pain? *Am J Obstet Gynecol* 197: 424.e1–424.e4.
- Ang LMN, Brown H (2007). *Corynebacterium accolens* isolated from breast abscess: possible association with granulomatous mastitis. *J Clin Microbiol* 45: 1666–1668.
- Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, *et al* (2004). Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J Clin Microbiol* 42: 4686–4696.
- Arbolea S, Sánchez B, Milani C, *et al* (2015). Intestinal microbiota development in preterm neonates and effect of perinatal antibiotics. *J Pediatr* 166: 538–544.
- Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM (2010). Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 50: 1551–1558.
- Arroyo R, Mediano P, Martín V, *et al* (2011). Diagnóstico etiológico de las mastitis infecciosas: propuesta de protocolo para el cultivo de muestras de leche humana. *Acta Pediatr Esp* 69: 276–281.
- Arslan F, Saltoglu N, Mete B, Mert A (2011). Recurrent *Staphylococcus warnerii* prosthetic valve endocarditis: a case report and review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 10: 14.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, *et al* (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473: 174–180.
- Aryeetey RNO, Marquis GS, Timms L, Lartey A, Brakohiapa L (2008). Subclinical mastitis is common among Ghanaian women lactating 3 to 4 months postpartum. *J Hum Lact* 24: 263–267.
- Asaf VNM, Amod A, Rahim A, *et al* (2014). An overview on single nucleotide polymorphism studies in mastitis research. *Veterinary World* 7: 416–421.
- Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T, *et al* (2011). Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *J Biol Chem* 286: 34583–34592.
- Asamblea Mundial de la Salud (1986). Resolución AMS39.28. *Alimentación del Lactante y del Niño Pequeño*. 33a Asamblea Mundial de la Salud, Ginebra, 5-16 mayo 1986. Volumen 1. Resoluciones y documentos. Organización Mundial de la Salud (WHA39/1986/REC/1), Anexo 6: 122–135.
- Asnis DS, John SS, Tickoo R, Arora A (2003). *Staphylococcus lugdunensis* breast abscess: is it Real? *Clin Infect Dis* 36: 1348–1348.
- Asociación Española de Pediatría-Comité de Lactancia Materna (2012).

- Recomendaciones sobre lactancia materna.* [www.aeped.es/comite-lactancia-materna/documentos/recomendaciones-sobre-lactancia-materna-comite-lactancia-materna]. Consultado: 9/9/2015
- Asociación Española de Pediatría-Comité de Lactancia Materna (1999). Informe técnico sobre la lactancia materna en España. *An Esp Pediatr* 50: 333-340.
- Asoglu O, Ozmen V, Karanlik H, *et al* (2005). Feasibility of surgical management in patients with granulomatous mastitis. *Breast J* 11: 108-114.
- Azlina AF, Ariza Z, Arni T, Hisham AN (2003). Chronic granulomatous mastitis: diagnostic and therapeutic considerations. *World J Surg* 27: 515-518.
- Bachur RG, Harper MB (2001). Predictive model for serious bacterial infections among infants younger than 3 months of age. *Pediatrics* 108: 311-316.
- Bakhshandeh-Nosrat S, Ghazisaidi K, Ghaemi E.O, Fatemi Nasab F, Mohamadi M (2007). The etiological agents of mastitis in lactating women in Iran. *Middle East J Fam Med* 5: 21-22.
- Balkam JJ (2010). Painful breast lumps in nursing mothers. *Am J Nurs* 110: 65-67.
- Ballard O, Morrow AL (2013). Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am* 60: 49-74.
- Barberis C, Almuzara M, Join-Lambert O, Ramírez MS, Famiglietti A, Vay C (2014). Comparison of the Bruker MALDI-TOF mass spectrometry system and conventional phenotypic methods for identification of gram-positive rods. *PLoS ONE* 9: e106303.
- Barbosa-Cesnik C, Schwartz K, Foxman B (2003). Lactation mastitis. *JAMA* 289: 1609-1612.
- Barreiro JR, Ferreira CR, Sanvido GB, *et al* (2010). Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Dairy Sci* 93: 5661-5667.
- Barrett ME, Heller MM, Fullerton Stone H, Murase JE (2013a). Dermatoses of the breast in lactation. *Dermatol Ther* 26: 331-336.
- Barrett ME, Heller MM, Stone HF, Murase JE (2013b). Raynaud phenomenon of the nipple in breastfeeding mothers: an underdiagnosed cause of nipple pain. *JAMA Dermatol* 149: 300-306.
- Bartick M, Reinhold A (2010). The burden of suboptimal breastfeeding in the United States: a pediatric cost analysis. *Pediatrics* 125: e1048-1056.
- Batterham PJ, Christensen H, Mackinnon AJ (2009). Modifiable risk factors predicting major depressive disorder at four year follow-up: a decision tree approach. *BMC Psychiatry* 9: 75.
- Beasley SS, Saris PEJ (2004). Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Appl Environ Microbiol* 70: 5051-5053.
- Beaussart A, Herman P, El-Kirat-Chatel S, *et al* (2013). Single-cell force spectroscopy of the medically important *Staphylococcus epidermidis*-*Candida albicans* interaction. *Nanoscale* 5: 10894-10900.
- Becker K, Heilmann C, Peters G (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 27: 870-926.
- Belet N, Hacıömeroğlu P, Küçüköçük S (2004). Ciprofloxacin treatment in newborns with multi-drug-resistant nosocomial *Pseudomonas* infections. *Biol Neonate* 85: 263-268.
- Beltrán Vaquero DA, Crespo Garzón AE, Rodríguez Bravo TC, García Iglesias Á (2015). Mastitis infecciosa: nueva solución para un viejo problema. *Nutr Hosp* 31 Suppl 1: 89-95.
- Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, LaPensee CR (2006). Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends Endocrinol Metab* 17: 110-116.
- Bercot B, Kannengiesser C, Oudin C, *et al* (2009). First description of NOD2 variant associated with defective neutrophil responses in a woman with granulomatous mastitis related to corynebacteria. *J Clin Microbiol* 47:

- 3034–3037.
- Berens P, Swaim L, Peterson B (2010). Incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in postpartum breast abscesses. *Breastfeed Med* 5: 113–115.
- Bergmann H, Rodríguez JM, Salminen S, Szajewska H (2014). Probiotics in human milk and probiotic supplementation in infant nutrition: a workshop report. *Br J Nutr* 112: 1119–1128.
- Bernard K (2012). The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J Clin Microbiol* 50: 3152–3158.
- Betzold CM (2007). An update on the recognition and management of lactational breast inflammation. *J Midwifery Womens Health* 52: 595–605.
- Betzold CM (2012). Results of microbial testing exploring the etiology of deep breast pain during lactation: a systematic review and meta-analysis of nonrandomized trials. *J Midwifery Womens Health* 57: 353–364.
- Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C (2010). Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev* 86 Suppl 1: 13–15.
- Binns CW, Win NN, Zhao Y, Scott JA (2006). Trends in the expression of breastmilk 1993–2003. *Breastfeed Rev* 14: 5–9.
- Bishop CJ, Aanensen DM, Jordan GE, Kilian M, Hanage WP, Spratt BG (2009). Assigning strains to bacterial species via the internet. *BMC Biol* 7: 3.
- Bizzarro MJ, Dembry L-M, Baltimore RS, Gallagher PG (2008). Changing patterns in neonatal *Escherichia coli* sepsis and ampicillin resistance in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* 121: 689–696.
- Björk S, Båge R, Kanyima BM, et al (2014). Characterization of coagulase negative staphylococci from cases of subclinical mastitis in dairy cattle in Kampala, Uganda. *Ir Vet J* 67: 12.
- Bode L (2012). Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 22: 1147–1162.
- Bode L (2015). The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early Hum Dev* 91: 619–622.
- Bode L, Jantscher-Krenn E (2012). Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Adv Nutr* 3: 383S–91S.
- Bode L, Rudloff S, Kunz C, Strobel S, Klein N (2004). Human milk oligosaccharides reduce platelet-neutrophil complex formation leading to a decrease in neutrophil beta 2 integrin expression. *J Leukoc Biol* 76: 820–826.
- Boehmer JL (2011). Proteomic analyses of host and pathogen responses during bovine mastitis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16: 323–338.
- Boehm G, Stahl B (2007). Oligosaccharides from Milk. *J Nutr* 137: 847S–849S.
- Boisserie-Lacroix M, Debled M, Tunon de Lara C, Hurtevent G, Asad-Syed M, Ferron S (2012). The inflammatory breast: management, decision-making algorithms, therapeutic principles. *Diagn Interv Imaging* 93: 126–136.
- Bonnefont CMD, Toufeer M, Caubet C, et al (2011). Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* 12: 208.
- Boo NY, Nordiah AJ, Alfizah H, Nor-Rohaini AH, Lim VK (2001). Contamination of breast milk obtained by manual expression and breast pumps in mothers of very low birthweight infants. *J Hosp Infect* 49: 274–281.
- Boswihi SS, Udo EE, Al-Sweih N (2012). Serotypes and antibiotic resistance in Group B streptococcus isolated from patients at the Maternity Hospital, Kuwait. *J Med Microbiol* 61: 126–131.
- Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S (2011). Métodos de identificación bacteriana en

- el laboratorio de microbiología. *Enferm Infect Microbiol Clin* 29: 601–608.
- Bourlieu C, Michalski M-C (2015). Structure-function relationship of the milk fat globule. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 18: 118–127.
- Boutet G (2012). Breast inflammation: Clinical examination, aetiological pointers. *Diagn Interv Imaging* 93: 78–84.
- Branch-Elliman W, Golen TH, Gold HS, Yassa DS, Baldini LM, Wright SB (2012). Risk factors for *Staphylococcus aureus* postpartum breast abscess. *Clin Infect Dis* 54: 71–77.
- Branch-Elliman W, Lee GM, Golen TH, Gold HS, Baldini LM, Wright SB (2013). Health and economic burden of post-partum *Staphylococcus aureus* breast abscess. *PLoS ONE* 8: e73155.
- Branda JA, Markham RP, Garner CD, Rychert JA, Ferraro MJ (2013). Performance of the Vitek MS v2.0 system in distinguishing *Streptococcus pneumoniae* from nonpneumococcal species of the *Streptococcus mitis* group. *J Clin Microbiol* 51: 3079–3082.
- Brandtzaeg P (2013). Immune aspects of breast milk: an overview. In: *Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk*. Human Health Handbooks. Volume 5. Zibadi S, Watson RR, Preedy VR (Eds). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, pp. 57–82.
- Brenna JT, Carlson SE (2014). Docosahexaenoic acid and human brain development: evidence that a dietary supply is needed for optimal development. *J Hum Evol* 77: 99–106.
- Brenna JT, Varamini B, Jensen RG, Diersen-Schade DA, Boettcher JA, Arterburn LM (2007). Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. *Am J Clin Nutr* 85: 1457–1464.
- Briskin C, O'Malley B (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a003178.
- Britten AM (2012). The role of diagnostic microbiology in mastitis control programs. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 28: 187–202.
- Brown SL, Bright RA, Dwyer DE, Foxman B (2005). Breast pump adverse events: reports to the food and drug administration. *J Hum Lact* 21: 169–174.
- Bruckner L, Gigliotti F (2006). Viridans group streptococcal infections among children with cancer and the importance of emerging antibiotic resistance. *Semin Pediatr Infect Dis* 17: 153–160.
- Bruminhent J, Tokarczyk MJ, Jungkind D, DeSimone JA (2013). *Rothia mucilaginosa* prosthetic device infections: a case of prosthetic valve endocarditis. *J Clin Microbiol* 51: 1629–1632.
- Buck ML, Amir LH, Cullinane M, Donath SM (2014). Nipple pain, damage, and vasospasm in the first 8 weeks postpartum. *Breastfeed Med* 9: 56–62.
- Bukowski M, Wladyka B, Dubin G (2010). Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins (Basel)* 2: 1148–1165.
- Burgos Portillo I, Mainero Ratchelou EF, Burgos Portillo R, Jaimes Cadena M (2012). Patología de la mama durante el embarazo y lactancia. *Rev Med La Paz* 18: 57–66.
- Burton JL, Erskine RJ (2003). Immunity and mastitis. Some new ideas for an old disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 19: 1–45.
- Büttner H, Mack D, Rohde H (2015). Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Front Cell Infect Microbiol* 5: 14.
- Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A (2012). The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* 96: 544–551.
- Cagno CK, Pettit JM, Weiss BD (2012). Prevention of perinatal group B



- streptococcal disease: updated CDC guideline. *Am Fam Physician* 86: 59–65.
- Camann W (2007). Labor analgesia and breast feeding: avoid parenteral narcotics and provide lactation support. *Int J Obstet Anesth* 16: 199–201.
- Camelo-Castillo A, Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Mira A (2014). *Streptococcus dentisani* sp. nov., a novel member of the mitis group. *Int J Syst Evol Microbiol* 64: 60–65.
- Campoccia D, Montanaro L, Visai L, *et al* (2010). Characterization of 26 *Staphylococcus warneri* isolates from orthopedic infections. *Int J Artif Organs* 33: 575–581.
- Cantrill RM, Creedy DK, Cooke M, Dykes F (2014). Effective suckling in relation to naked maternal-infant body contact in the first hour of life: an observation study. *BMC Pregnancy Childbirth* 14: 20.
- Capanna F, Emonet SP, Cherkaoui A, Irion O, Schrenzel J, Martinez de Tejada B (2013). Antibiotic resistance patterns among group B *Streptococcus* isolates: implications for antibiotic prophylaxis for early-onset neonatal sepsis. *Swiss Med Wkly* 143: w13778.
- Carberry AE, Raynes-Greenow CH, Turner RM, Jeffery HE (2013). Breastfeeding within the first hour compared to more than one hour reduces risk of early-onset feeding problems in term neonates: a cross-sectional study. *Breastfeed Med* 8: 513–514.
- Carmichael AR, Dixon JM (2002). Is lactation mastitis and shooting breast pain experienced by women during lactation caused by *Candida albicans*? *Breast* 11: 88–90.
- Carneiro-Proietti ABF, Amaranto-Damasio MS, Leal-Horiguchi CF, *et al* (2014). Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic viruses-1/2: what we know, and what are the gaps in understanding and preventing this route of infection. *J Pediatric Infect Dis Soc* 3: S24–S29.
- Carrera M, Arroyo R, Mediano P, Fernández L, Marín M, Rodríguez JM (2012). Lactancia materna y mastitis. Tratamiento empírico basado en la sintomatología y los agentes etiológicos. *Acta Pediátrica Española* 70: 255–261.
- Carroll L, Davies DP, Osman M, Mcneish AS (1979). Bacteriological criteria for feeding raw breast-milk to babies on neonatal units. *The Lancet* 314: 732–733.
- Casadevall A, Pirofski L (2003). The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 1: 17–24.
- Charpak N, Ruiz JG, Zupan J, *et al* (2005). Kangaroo Mother Care: 25 years after. *Acta Paediatr* 94: 514–522.
- Chassard C, de Wouters T, Lacroix C (2014). Probiotics tailored to the infant: a window of opportunity. *Curr Opin Biotechnol* 26: 141–147.
- Chichlowski M, German JB, Lebrilla CB, Mills DA (2011). The influence of milk oligosaccharides on microbiota of infants: opportunities for formulas. *Annu Rev Food Sci Technol* 2: 331–351.
- Chien L-Y, Tai C-J (2007). Effect of delivery method and timing of breastfeeding initiation on breastfeeding outcomes in Taiwan. *Birth* 34: 123–130.
- Chi F, Nolte O, Bergmann C, Ip M, Hakenbeck R (2007). Crossing the barrier: evolution and spread of a major class of mosaic *pbp2x* in *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Int J Med Microbiol* 297: 503–512.
- Chowdhury AK, Mubin S, Yousuf NA, Rahman M, Islam MA, Ahmed SU (2015a). Bilateral tubercular mastitis - Case reports. *Mymensingh Med J* 24: 610–614.
- Chowdhury R, Sinha B, Sankar MJ, *et al* (2015b). Breastfeeding and maternal health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr* [doi: 10.1111/apa.13102].
- Chu YW, Tse C, Tsang GK-L, So DK-S, Fung JT-L, Lo JY-C (2007). Invasive

- group B *Streptococcus* isolates showing reduced susceptibility to penicillin in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother* 60: 1407–1409.
- Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 26: 547–603.
- Clarridge JE (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17: 840–862.
- Clemons SN, Amir LH (2010). Breastfeeding women's experience of expressing: a descriptive study. *J Hum Lact* 26: 258–265.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100–S25. Wayne, PA, USA.
- Coates MM (1992). Nipple pain related to vasospasm in the nipple? *J Hum Lact* 8: 153.
- Coca KP, Gamba MA, de Sousa e Silva R, Abrão ACF de V (2009). Does breastfeeding position influence the onset of nipple trauma? *Rev Esc Enferm USP* 43: 446–452.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (2002). Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50,302 women with breast cancer and 96,973 women without the disease. *Lancet* 360: 187–195.
- Collado MC, Delgado S, Maldonado A, Rodríguez JM (2009). Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 48: 523–528.
- Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E (2012). Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk. *Pediatr Res* 72: 77–85.
- Collins MD, Falsen E, Akervall E, Sjöden B, Alvarez A (1998). *Corynebacterium kroppenstedtii* sp. nov., a novel corynebacterium that does not contain mycolic acids. *Int J Syst Bacteriol* 48 Pt 4: 1449–1454.
- Collins CT, Makrides M, Gillis J, McPhee AJ (2008). Avoidance of bottles during the establishment of breast feeds in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*: CD005252.
- Contreras GA, Rodríguez JM (2011). Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16: 339–356.
- Cooper A (1845). *The Anatomy and Diseases of the Breast*. Lea and Blanchard, Philadelphia.
- Costanza MC, Paccaud F (2004). Binary classification of dyslipidemia from the waist-to-hip ratio and body mass index: a comparison of linear, logistic, and CART models. *BMC Med Res Methodol* 4: 7.
- Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 326: 1694–1697.
- Cregan MD, Hartman PE (1999). Computerized breast measurement from conception to weaning: clinical implications. *J Hum. Lact* 15: 89–96.
- Cusack L, Brennan M (2011). Lactational mastitis and breast abscess-diagnosis and management in general practice. *Aust Fam Physician* 40: 976–979.
- D'Alessandro A, Scaloni A, Zolla L (2010). Human milk proteins: an interactomics and updated functional overview. *J Proteome Res* 9: 3339–3373.
- Dalhoff A (2012). Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2012: 976273.
- Daly SE, Hartmann PE (1995a). Infant demand and milk supply. Part 1: Infant demand and milk production in lactating women. *J Hum Lact* 11: 21–

- 26.
- Daly SE, Hartmann PE (1995b). Infant demand and milk supply. Part 2: The short-term control of milk synthesis in lactating women. *J Hum Lact* 11: 27–37.
- Daniels JP, Gray J, Pattison HM, *et al* (2011). Intrapartum tests for group B streptococcus: accuracy and acceptability of screening. *BJOG* 118: 257–265.
- Davenport C, Caudill MA (2013). Choline and milk. In: *Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk*. Human Health Handbooks. Volume 5. Zibadi S, Watson RR, Preedy VR (Eds). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, pp. 335–352.
- Davies AP, Reid M, Hadfield SJ, *et al* (2012). Identification of clinical isolates of  $\alpha$ -hemolytic streptococci by 16s rRNA gene sequencing, matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry using MALDI Biotyper, and conventional phenotypic methods: a comparison. *J Clin Microbiol* 50: 4087–4090.
- de Araújo M de FM, Schmitz B de AS (2007). Twelve years of the Baby-Friendly Hospital Initiative in Brazil [Article in Portuguese]. *Rev Panam Salud Publica* 22: 91–99.
- De Vreese K, Verhaegen J (2013). Identification of coryneform *Actinomyces neuii* by MALDI TOF MS: 5 case reports and review of literature. *Acta Clin Belg* 68: 210–214.
- Deb R, Kumar A, Chakraborty S, *et al* (2013). Trends in diagnosis and control of bovine mastitis: a review. *Pak J Biol Sci* 16: 1653–1661.
- Deghorain M, Van Melderden L (2012). The *Staphylococci* phages family: an overview. *Viruses* 4: 3316–3335.
- Delgado S, García-Garrote F, Padilla B, Rodríguez JM, Romero B (2015). *Diagnóstico microbiológico de la infección bacteriana asociada al parto y al puerperio*. Padilla B (Coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica 54. SEIMC.
- Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez J (2009a). Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (I). *Acta Pediatr Esp* 67: 77–84.
- Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, *et al* (2009b). *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiol* 9: 82.
- Delgado S, Arroyo R, Martín R, Rodríguez JM (2008). PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infect Dis* 8: 51.
- Delgado S, Collado MC, Fernández L, Rodríguez JM (2009c). Bacterial analysis of breast milk: a tool to differentiate Raynaud’s phenomenon from infectious mastitis during lactation. *Curr Microbiol* 59: 59–64.
- Delgado S, García P, Fernández L, *et al* (2011). Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62: 225–235.
- Denapate D, Bruckner R, Nuhn M, *et al* (2010). The Genome of *Streptococcus mitis* B6-What Is a Commensal? *PLoS One* 5.
- Dennis C-L, Jackson K, Watson J (2014). Interventions for treating painful nipples among breastfeeding women. *Cochrane Database Syst Rev* 12: CD007366.
- Di Renzo GC, Melin P, Berardi A, *et al* (2015). Intrapartum GBS screening and antibiotic prophylaxis: a European consensus conference. *J Matern Fetal Neonatal Med* 28: 766–782.
- Díaz NM (2004). Retención y mastitis. En: *Lactancia materna: guía para profesionales*. Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría. Monografías de la Asociación Española de Pediatría N° 5. Ergon, Madrid, pp. 235–241.
- Díaz-Gómez (2005). ¿En qué situaciones está contraindicada la lactancia materna? *Acta Pediatr Esp* 63: 321–327.

- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, *et al* (2001). Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 32 Suppl 2: S114-132.
- Dieterich CM, Felice JP, O'Sullivan E, Rasmussen KM (2013). Breastfeeding and health outcomes for the mother-infant dyad. *Pediatr Clin North Am* 60: 31-48.
- Dixon JM, Khan LR (2011). Treatment of breast infection. *BMJ* 342: d396-d396.
- Dobinson HC, Anderson TP, Chambers ST, Doogue MP, Seaward L, Werno AM (2015). Antimicrobial treatment options for granulomatous mastitis caused by *Corynebacterium* species. *J Clin Microbiol*.
- Doern CD, Burnham C-AD (2010). It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. *J Clin Microbiol* 48: 3829-3835.
- Dollberg S, Marom R, Botzer E (2014). Lingual frenotomy for breastfeeding difficulties: a prospective follow-up study. *Breastfeed Med* 9: 286-289.
- Donlan RM, Costerton JW (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167-193.
- Donnet-Hughes A, Perez PF, Doré J, *et al* (2010). Potential role of the intestinal microbiota of the mother in neonatal immune education. *Proc Nutr Soc* 69: 407-415.
- Donovan SM (2008). Human milk: nutritional properties. In: *Nutrition in Pediatrics 4. Basic Science, Clinical Applications*. Duggan C, Watkins J, Walker WA (Eds.). BC Decker Inc, Ontario, Canada, pp: 341-353.
- Dozier AM, Howard CR, Brownell EA, *et al* (2013). Labor epidural anesthesia, obstetric factors and breastfeeding cessation. *Matern Child Health J* 17: 689-698.
- Drossou-Agakidou V, Roilides E, Papakyriakidou-Koliouska P, *et al* (2004). Use of ciprofloxacin in neonatal sepsis: lack of adverse effects up to one year. *Pediatr Infect Dis J* 23: 346-349.
- Dubois D, Segonds C, Prere M-F, Marty N, Oswald E (2013). Identification of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates among other alpha and nonhemolytic streptococci by use of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *J Clin Microbiol* 51: 1861-1867.
- Duijts L, Jaddoe VWV, Hofman A, Moll HA (2010). Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy. *Pediatrics* 126: e18-25.
- Dunn R, Bares S, David MZ (2011). Central venous catheter-related bacteremia caused by *Kocuria kristinae*: Case report and review of the literature. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 10: 31.
- Dutta S, Chowdhary G, Kumar P, Mukhopadhyay K, Narang A (2006). Ciprofloxacin administration to very low birth weight babies has no effect on linear growth in infancy. *J Trop Pediatr* 52: 103-106.
- Ebringer A, Wilson C (2000). HLA molecules, bacteria and autoimmunity. *J Med Microbiol* 49: 305-311.
- Edmunds J, Miles SC, Fulbrook P (2011). Tongue-tie and breastfeeding: a review of the literature. *Breastfeed Rev* 19: 19-26.
- Edwards MS, Nizet V, Baker CJ (2006). Group B Streptococcal Infections. In: *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*, 6th Edition. Remington JS, *et al.* (Eds.). W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 403-464.
- Eglash A, Montgomery A, Wood J (2008). Breastfeeding. *Dis Mon* 54: 343-411.
- Eglash A, Proctor R (2007). Case report: a breastfeeding mother with chronic breast pain. *Breastfeed Med* 2: 99-104.
- Eidelman AI, Szilagyi G (1979). Patterns of bacterial colonization of human milk.

- Obstet Gynecol* 53: 550–552.
- Eisenberg SR, Bair-Merritt MH, Colson ER, Heeren TC, Geller NL, Corwin MJ (2015). Maternal report of advice received for infant care. *Pediatrics* 136: e315–322.
- El-Mohandes AE, Schatz V, Keiser JF, Jackson BJ (1993). Bacterial contaminants of collected and frozen human milk used in an intensive care nursery. *Am J Infect Control* 21: 226–230.
- Engür D, Çetinkaya Çakmak B, Kaynak Türkmen M, Telli M, Eyigör M, Güzünler M (2014). A milk pump as a source for spreading *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit. *Breastfeed Med* 9: 551–554.
- Erozgen F, Ersoy YE, Akaydin M, *et al* (2010). Corticosteroid treatment and timing of surgery in idiopathic granulomatous mastitis confusing with breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 123: 447–452.
- Espinosa-Martos I, Montilla A, de Segura AG, *et al* (2013). Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after Holder pasteurisation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 56: 560–568.
- Evans A, Marinelli KA, Taylor JS, Academy of Breastfeeding Medicine (2014). ABM clinical protocol #2: Guidelines for hospital discharge of the breastfeeding term newborn and mother: ‘The going home protocol,’ revised 2014. *Breastfeed Med* 9: 3–8.
- Facklam R (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 15: 613–630.
- Faiad G (2011). *Rothia mucilaginosa* life threatening infections in non-neutropenic hosts. *Open J Int Med* 1: 68–71.
- Fall CH, Borja JB, Osmond C, *et al* (2011). Infant-feeding patterns and cardiovascular risk factors in young adulthood: data from five cohorts in low- and middle-income countries. *Int J Epidemiol* 40: 47–62.
- Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, *et al* (2012). Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput Biol* 8: e1002606.
- Fernández L, Arroyo R, Espinosa I, Marín M, Jiménez E, Rodríguez JM (2014). Probiotics for human lactational mastitis. *Benef Microbes* 5: 169–183.
- Fernández L, Delgado S, Herrero H, Maldonado A, Rodríguez JM (2008). The bacteriocin nisin, an effective agent for the treatment of staphylococcal mastitis during lactation. *J Hum Lact* 24: 311–316.
- Fernández L, Langa S, Martín V, *et al* (2013). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 69: 1–10.
- Fernández L, Rodríguez JM (Eds.) (2014). *Mastitis, el lado oscuro de la lactancia. Microbiota mamaria: de la fisiología a las mastitis*. ISBN: 978-84-617-1164-2. Probisearch, Madrid.
- Fernández-Natal I, Guerra J, Alcoba M, Cachón F, Soriano F (2001). Bacteremia caused by multiply resistant *Corynebacterium urealyticum*: six case reports and review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 514–517.
- Fetherston CM, Lai CT, Hartmann PE (2006). Relationships between symptoms and changes in breast physiology during lactation mastitis. *Breastfeed Med* 1: 136–145.
- Fey PD, Olson ME (2010). Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiol* 5: 917–933.
- Fijałkowski K, Masiuk H, Czernomysy-Furowicz D, *et al* (2013). Superantigen gene profiles, genetic relatedness and biological activity of exosecretions of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from milk of cows with clinical mastitis. *Microbiol Immunol* 57: 674–683.
- Fijałkowski K, Struk M, Karakulska J, *et al* (2014). Comparative analysis of superantigen genes in *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus aureus* isolates collected from a single

- mammary quarter of cows with mastitis. *J Microbiol* 52: 366–372.
- Filleron A, Lombard F, Jacquot A, *et al* (2014). Group B streptococci in milk and late neonatal infections: an analysis of cases in the literature. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 99: F41–47.
- Fitzgibbons SC, Ching Y, Yu D, *et al* (2009). Mortality of necrotizing enterocolitis expressed by birth weight categories. *J Pediatr Surg* 44: 1072–1075; discussion 1075–1076.
- Flaherman VJ, Lee HC (2013). ‘Breastfeeding’ by feeding expressed mother’s milk. *Pediatr Clin North Am* 60: 227–246.
- Fleith M, Clandinin MT (2005). Dietary PUFA for preterm and term infants: review of clinical studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45: 205–229.
- Foley NM, Wang J, Redmond HP, Wang JH (2015). Current knowledge and future directions of TLR and NOD signaling in sepsis. *Mil Med Res* 2: 1.
- Forsman CL, Schwertfeger KL (2013). Mammary gland development and structure: an overview. In: *Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk*. Human Health Handbooks. Volume 5. Zibadi S, Watson RR, Preedy VR (Eds). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, pp. 15–34.
- Forster DA, Johns HM, McLachlan HL, Moorhead AM, McEgan KM, Amir LH (2015). Feeding infants directly at the breast during the postpartum hospital stay is associated with increased breastfeeding at 6 months postpartum: a prospective cohort study. *BMJ Open* 5: e007512.
- Fournier B, Philpott DJ (2005). Recognition of *Staphylococcus aureus* by the innate immune system. *Clin Microbiol Rev* 18: 521–540.
- Fox LK, Zadoks RN, Gaskins CT (2005). Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet Microbiol* 107: 295–299.
- Foxman B, D’Arcy H, Gillespie B, Bobo JK, Schwartz K (2002). Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. *Am J Epidemiol* 155: 103–114.
- Francino MP (2014). Early development of the gut microbiota and immune health. *Pathogens* 3: 769–790.
- Francis-Morrill J, Heinig MJ, Pappagianis D, Dewey KG (2004). Diagnostic value of signs and symptoms of mammary candidosis among lactating women. *J Hum Lact* 20: 288–295; quiz 296–299.
- Friedrichs C, Rodloff AC, Chhatwal GS, Schellenberger W, Eschrich K (2007). Rapid identification of viridans streptococci by mass spectrometric discrimination. *J Clin Microbiol* 45: 2392–2397.
- Funke G, Graevenitz A von, Clarridge JE, Bernard KA (1997). Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev* 10: 125–159.
- Funkhouser LJ, Bordenstein SR (2013). Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol* 11: e1001631.
- Furth PA (1999). Introduction: mammary gland involution and apoptosis of mammary epithelial cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4: 123–127.
- García LS (Ed.) (2010). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 3rd Edition. ASM Press, Washington, DC.
- Geddes DT, Prescott SL (2013). Developmental origins of health and disease the role of human milk in preventing disease in the 21st century. *J Hum Lact* 29: 123–127.
- Gerald LB, Tang S, Bruce F, *et al* (2002). A decision tree for tuberculosis contact investigation. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 1122–1127.
- Gil-Campos M, López MÁ, Rodríguez-Benítez MV, *et al* (2012). *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1–6 months of age: a randomized controlled trial. *Pharmacol Res* 65: 231–238.
- Gill SR, Fouts DE, Archer GL, *et al* (2005).

- Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol* 187: 2426–2438.
- Gillespie BE, Oliver SP (2005). Simultaneous detection of mastitis pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae* by multiplex real-time polymerase chain reaction. *J Dairy Sci* 88: 3510–3518.
- Gillman MW, Rifas-Shiman SL, Camargo, Jr CA, et al (2001). Risk of overweight among adolescents who were breastfed as infants. *JAMA* 285: 2461–2467.
- Girschick HJ, Guilherme L, Inman RD, et al (2008). Bacterial triggers and autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol* 26: S12–17.
- Gonçalves JL, Tomazi T, Barreiro JR, et al (2014). Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Vet Microbiol* 173: 147–151.
- González R, Mandomando I, Fumadó V, et al (2013). Breast milk and gut microbiota in African mothers and infants from an area of high HIV prevalence. *PLoS ONE* 8: e80299.
- Gooding MJ, Finlay J, Shipley JA, Halliwell M, Duck FA (2010). Three-dimensional ultrasound imaging of mammary ducts in lactating women: a feasibility study. *J Ultrasound Med* 29: 95–103.
- Goyal RC, Banginwar AS, Ziyo F, Toweir AA (2011). Breastfeeding practices: Positioning, attachment (latch-on) and effective suckling-A hospital-based study in Libya. *J Family Community Med* 18: 74–79.
- Grice EA, Segre JA (2011). The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 9: 244–253.
- Grönlund M-M, Gueimonde M, Laitinen K, et al (2007). Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 37: 1764–1772.
- Guerrero C, Sánchez C (2003). *Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología*. Sánchez C (Coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica 1a. SEIMC.
- Günaydın B, Aslantaş Ö, Demir C (2011). Detection of superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains from subclinical bovine mastitis. *Trop Anim Health Prod* 43: 1633–1637.
- Gurjar A, Gioia G, Schukken Y, Welcome F, Zadoks R, Moroni P (2012). Molecular diagnostics applied to mastitis problems on dairy farms. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 28: 565–576.
- Gurleyik G, Aktekin A, Aker F, Karagulle H, Saglamc A (2012). Medical and surgical treatment of idiopathic granulomatous lobular mastitis: a benign inflammatory disease mimicking invasive carcinoma. *J Breast Cancer* 15: 119–123.
- Gürpınar AN, Balkan E, Kiliç N, Kiriştioglu I, Doğruyol H (1997). The effects of a fluoroquinolone on the growth and development of infants. *J Int Med Res* 25: 302–306.
- Gusterson BA, Stein T (2012). Human breast development. *Semin Cell Dev Biol* 23: 567–573.
- Hakenbeck R, Balmelle N, Weber B, Gardes C, Keck W, de Saizieu A (2001). Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69: 2477–2486.
- Hale TW, Bateman TL, Finkelman MA, Berens PD (2009). The absence of *Candida albicans* in milk samples of women with clinical symptoms of ductal candidiasis. *Breastfeed Med* 4: 57–61.
- Hameed KGA, Sender G, Mayntz M (2006). Major histocompatibility complex

- polymorphism y mastitis resistance-a review. *Anim Sci Pap Rep* 24: 11–25.
- Hamosh M (2001). Bioactive factors in human milk. *Pediatr Clin North Am* 48: 69–86.
- Hamprecht K, Maschmann J, Müller D, *et al* (2004). Cytomegalovirus (CMV) inactivation in breast milk: reassessment of pasteurization and freeze-thawing. *Pediatr Res* 56: 529–535.
- Hani U, Shivakumar HG, Vaghela R, Osmani RAM, Shrivastava A (2015). Candidiasis: a fungal infection- current challenges and progress in prevention and treatment. *Infect Disord Drug Targets* 15: 42–52.
- Harper PR (2005). A review and comparison of classification algorithms for medical decision making. *Health Policy* 71: 315–331.
- Harriott MM, Noverr MC (2009). *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3914–3922.
- Hassiotou F, Geddes DT (2015). Immune cell-mediated protection of the mammary gland and the infant during breastfeeding. *Adv Nutr* 6: 267–275.
- Hauck FR, Thompson JMD, Tanabe KO, Moon RY, Vennemann MM (2011). Breastfeeding and reduced risk of sudden infant death syndrome: a meta-analysis. *Pediatrics* 128: 103–110.
- Heath PT, Balfour G, Weisner AM, *et al* (2004). Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days. *Lancet* 363: 292–294.
- Heikkilä MP, Saris PE (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* 95: 471–478.
- Hello M, Néel A, Graveleau J, *et al* (2013). Idiopathic granulomatous mastitis. *Rev Med Interne* 34: 358–362.
- Hernández-Aguilar MT, Lasarte-Velillas JJ, Martín-Calama J, *et al* (2014). The Baby-Friendly initiative in Spain a challenging pathway. *J Hum Lact* 30: 276–282.
- Herrero H (2008). Propuesta de abordaje dolor y lesiones en los pezones y mama. *Medicina naturista* 2: 41–52.
- Hettinga KA, van Valenberg HJF, Lam TJGM, van Hooijdonk ACM (2008). Detection of mastitis pathogens by analysis of volatile bacterial metabolites. *J Dairy Sci* 91: 3834–3839.
- Hettinga KA, van Valenberg HJF, Lam TJGM, van Hooijdonk ACM (2009). The origin of the volatile metabolites found in mastitis milk. *Vet Microbiol* 137: 384–387.
- Hettinga K, van Valenberg H, de Vries S, *et al* (2011). The host defense proteome of human and bovine milk. *PLoS ONE* 6: e19433.
- Hinić V, Lang C, Weisser M, Straub C, Frei R, Goldenberger D (2012). *Corynebacterium tuberculostrictum*: a potentially misidentified and multiresistant *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 50: 2561–2567.
- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 9: 486–493.
- Hladik M, Schoeller T, Ensaf F, Wechselberger G (2011). Idiopathic granulomatous mastitis: successful treatment by mastectomy and immediate breast reconstruction. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 64: 1604–1607.
- Hoefler C, Hardy MC (1929). Later development of breast fed and artificially fed infants. *J Am Med Assoc* 92: 615–620.
- Hogg NA, Harrison CJ, Tickle C (1983). Lumen formation in the developing mouse mammary gland. *J Embryol Exp Morphol* 73: 39–57.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 35: 322–332.
- Høiby N, Ciofu O, Johansen HK, *et al* (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci* 3: 55–65.



- Holmes MA, Zadoks RN (2011). Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16: 373–382.
- Horta BL, Victora CG (2013). Long-term effects of breastfeeding: a systematic review. World Health Organization, Geneva. p. 74.
- Horta BL, de Mola CL, Victora CG (2015). Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure, and type-2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr* [doi: 10.1111/apa.13133].
- Horvath T, Madi BC, Iuppa IM, Kennedy GE, Rutherford G, Read JS (2009). Interventions for preventing late postnatal mother-to-child transmission of HIV. *Cochrane Database Syst Rev*: CD006734.
- Hoshino T, Fujiwara T, Kilian M (2005). Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. *J Clin Microbiol* 43: 6073–6085.
- Hovinen M, Siivonen J, Taponen S, *et al* (2008). Detection of clinical mastitis with the help of a thermal camera. *J Dairy Sci* 91: 4592–4598.
- Howard BA, Gusterson BA (2000). Human breast development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5: 119–137.
- Hrabák J, Chudácková E, Walková R (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 26: 103–114.
- Hsueh W, Caplan MS, Qu X-W, Tan X-D, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F (2003). Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts. *Pediatr Dev Pathol* 6: 6–23.
- Huch M, De Bruyne K, Cleenwerck I, *et al* (2013). *Streptococcus rubneri* sp. nov., isolated from the human throat. *Int J Syst Evol Microbiol* 63: 4026–4032.
- Huh SY, Rifas-Shiman SL, Zera CA, *et al* (2012). Delivery by caesarean section and risk of obesity in preschool age children: a prospective cohort study. *Arch Dis Child* 97: 610–616.
- Humenick SS, Hill PD, Thompson J, Hart AM (1998). Breast-milk sodium as a predictor of breastfeeding patterns. *Can J Nurs Res* 30: 67–81.
- Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, *et al* (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS ONE* 6: e21313.
- Hunt KM, Preuss J, Nissan C, *et al* (2012). Human milk oligosaccharides promote the growth of staphylococci. *Appl Environ Microbiol* 78: 4763–4770.
- Huurre A, Kalliomäki M, Rautava S, Rinne M, Salminen S, Isolauri E (2008). Mode of delivery- effects on gut microbiota and humoral immunity. *Neonatology* 93: 236–240.
- Ieven M (2000). Molecular methods in the diagnostic microbiology laboratory: when to start and where to stop? *Verh K Acad Geneesk Belg* 62: 15–30.
- Ikryannikova LN, Filimonova AV, Malakhova MV, *et al* (2013). Discrimination between *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mitis* based on sorting of their MALDI mass spectra. *Clin Microbiol Infect* 19: 1066–1071.
- Ikryannikova LN, Lapin KN, Malakhova MV, *et al* (2011). Misidentification of alpha-hemolytic streptococci by routine tests in clinical practice. *Infect Genet Evol* 11: 1709–1715.
- Imai CM, Gunnarsdottir I, Thorisdottir B, Halldorsson TI, Thorsdottir I (2014). Associations between infant feeding practice prior to six months and body mass index at six years of age. *Nutrients* 6: 1608–1617.
- Ingram J, Johnson D, Copeland M, Churchill C, Taylor H, Emond A (2015). The development of a tongue assessment tool to assist with tongue-tie identification. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 100: F344–348.

- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) (2009). Classification of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*): guidelines for reporting novel SCC*mec* elements. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 4961–4967.
- Ip S, Chung M, Raman G, *et al* (2007). Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*: 1–186.
- Ip S, Chung M, Raman G, Trikalinos TA, Lau J. (2009). A summary of the Agency for Healthcare Research and Quality's evidence report on breastfeeding in developed countries. *Breastfeed Med* 4 Suppl 1: S17-30.
- Itoh Y, Kawamura Y, Kasai H, *et al* (2006). *dnaJ* and *gyrB* gene sequence relationship among species and strains of genus *Streptococcus*. *Syst Appl Microbiol* 29: 368–374.
- Jaafar SH, Jahanfar S, Angolkar M, Ho JJ (2011). Pacifier use versus no pacifier use in breastfeeding term infants for increasing duration of breastfeeding. *Cochrane Database Syst Rev*: CD007202.
- Jacob SG, Ramani RG (2012). Data mining in clinical data sets: a review. *Int J Appl Inform Syst* 4: 15–26.
- Jacobsen AS, Jenssen H (2012). Human cathelicidin LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Future Med Chem* 4: 1587–1599.
- Jain A, Agarwal A, Verma RK, Awasthi S, Singh KP (2011). Intravenous device associated blood stream staphylococcal infection in paediatric patients. *Indian J Med Res* 134: 193–199.
- Jain A, Concato J, Leventhal JM (2002). How good is the evidence linking breastfeeding and intelligence? *Pediatrics* 109: 1044–1053.
- Jain A, Jain S, Rawat S (2010). Emerging fungal infections among children: a review on its clinical manifestations, diagnosis, and prevention. *J Pharm Bioallied Sci* 2: 314–320.
- Jakobsson HE, Abrahamsson TR, Jenmalm MC, Harris K, Quince C, *et al* (2014). Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut* 63: 559–566.
- Jeong K, Nguyen V, Kim J (2012). Human milk oligosaccharides: the novel modulator of intestinal microbiota. *BMB Rep* 45: 433–441.
- Jeurink PV, van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, *et al* (2013). Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes* 4: 17–30.
- Jiménez E, de Andrés J, Manrique M, *et al* (2015). Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women. *J Hum Lact* 31: 406–415.
- Jiménez E, Delgado S, Arroyo R, Fernández L, Rodríguez JM (2009). Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (y II). *Acta Pediatr Esp* 67: 125–132.
- Jiménez E, Delgado S, Fernández L, *et al* (2008a). Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Res Microbiol* 159: 595–601.
- Jiménez E, Delgado S, Maldonado A, *et al* (2008b). *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol* 8: 143.
- Jiménez E, Fernández L, Maldonado A, *et al* (2008c). Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microbiol* 74: 4650–4655.
- Jiménez E, Fernández L, Marín ML, *et al* (2005). Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 51: 270–274.
- Jiménez E, Langa S, Martín V, *et al* (2010a). Complete genome sequence of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a

- probiotic strain isolated from human milk. *J Bacteriol* 192: 4800.
- Jiménez E, Martín R, Maldonado A, *et al* (2010b). Complete genome sequence of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a probiotic strain isolated from human milk and infant feces. *J Bacteriol* 192: 5266–5267.
- Jiménez E, Villar-Tajadura MA, Marín M, *et al* (2012). Complete genome sequence of *Bifidobacterium breve* CECT 7263, a strain isolated from human milk. *J Bacteriol* 194: 3762–3763.
- Jiménez-Granado R, Sánchez-Rodríguez M, Arce C, Rodríguez-Estévez V (2014). Factors affecting somatic cell count in dairy goats: a review. *Span J Agric Res* 12(1): 133–150.
- Joffe TH, Simpson NA (2009). Cesarean section and risk of asthma. The role of intrapartum antibiotics: a missing piece? *J Pediatr* 154: 154.
- Johns HM, Forster DA, Amir LH, McLachlan HL (2013). Prevalence and outcomes of breast milk expressing in women with healthy term infants: a systematic review. *BMC Pregnancy Childbirth* 13: 212.
- Johns HM, Forster DA, Amir LH, Moorhead AM, McEgan KM, McLachlan HL (2013). Infant feeding practices in the first 24–48 h of life in healthy term infants. *Acta Paediatr* 102: e315–320.
- Johnson MC (2010). Anatomy and physiology of the breast. In: *Management of Breast Diseases*. Jatoi I, Kaufmann M (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 1–36.
- Joshi S, Dialani V, Marotti J, Mehta TS, Slanetz PJ (2013). Breast disease in the pregnant and lactating patient: radiological-pathological correlation. *Insights Imaging* 4: 527–538.
- Joshi PA, Di Grappa MA, Khokha R (2012). Active allies: hormones, stem cells and the niche in adult mammapoiesis. *Trends Endocrinol Metab* 23: 299–309.
- Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br J Nutr* 110: 1253–1262.
- Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C (2015). Impact of human milk bacteria and oligosaccharides on neonatal gut microbiota establishment and gut health. *Nutr Rev* 73: 426–437.
- Jütte J, Hohoff A, Sauerland C, Wiechmann D, Stamm T (2014). In vivo assessment of number of milk duct orifices in lactating women and association with parameters in the mother and the infant. *BMC Pregnancy Childbirth* 14: 124.
- Kant R, Taponen S, Koort J, Paulin L, Åvall-Jääskeläinen S, Palva A (2015). Genome sequences of four *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. *Genome Announc* 3: e00334–15.
- Kärpänöja P, Harju I, Rantakokko-Jalava K, Haanperä M, Sarkkinen H (2014). Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of viridans group streptococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33: 779–788.
- Kataria K, Srivastava A, Dhar A (2013). Management of lactational mastitis and breast abscesses: review of current knowledge and practice. *Indian J Surg* 75: 430–435.
- Kawai T, Akira S (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11: 373–384.
- Kawamura Y, Hou X-G, Sultana F, Miura H, Ezaki T (1995). Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 45: 406–408.
- Keating EM, Curtis BA, Slusher TM (2013). Maternal milk volume and breast milk expression: implications for diet and nutrition in infants. In: *Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk*. Human Health Handbooks. Volume 5. Zibadi S, Watson RR, Preedy VR (Eds.). Wageningen Academic Publishers,

- Wageningen, the Netherlands, pp. 193–214.
- Keefe GP (1997). *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can Vet J* 38: 429–437.
- Kent JC (2007). How breastfeeding works. *J Midwifery Womens Health* 52: 564–570.
- Kent JC, Mitoulas LR, Cregan MD, Ramsay DT, Doherty DA, Hartmann PE (2006). Volume and frequency of breastfeedings and fat content of breast milk throughout the day. *Pediatrics* 117: e387–e395.
- Kępka A, Chojnowska S, Okunbowa OE, Zwierz K (2014). The role of carnitine in the perinatal period. *Dev Period Med* 18: 417–425.
- Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado MC, Martínez-Costa C (2014). Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *J Perinatol* 34: 599–605.
- Kilian M, Poulsen K, Blomqvist T, *et al* (2008). Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and Its Close Commensal Relatives. *PLoS ONE* 3: e2683.
- Kim TN, Kim JM, Won JC, *et al* (2012). A decision tree-based approach for identifying urban-rural differences in metabolic syndrome risk factors in the adult Korean population. *J Endocrinol Invest* 35: 847–852.
- Kinlay JR, O'Connell DL, Kinlay S (2001). Risk factors for mastitis in breastfeeding women: results of a prospective cohort study. *Aust N Z J Public Health* 25: 115–120.
- Koh HC, Tan G (2005). Data mining applications in healthcare. *J Healthc Inf Manag* 19: 64–72.
- Kok KYY, Telisinghe PU (2010). Granulomatous mastitis: presentation, treatment and outcome in 43 patients. *Surgeon* 8: 197–201.
- Koletzko B, Bhutta ZA, Cai W, *et al* (2013). Compositional requirements of follow-up formula for use in infancy: recommendations of an international expert group coordinated by the Early Nutrition Academy. *Ann Nutr Metab* 62: 44–54.
- Koletzko B, von Kries R, Monasterolo RC, *et al* (2009). Infant feeding and later obesity risk. *Adv Exp Med Biol* 646: 15–29.
- Koletzko B, Rodriguez-Palmero M, Demmelmair H, Fidler N, Jensen R, Sauerwald T (2001). Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum Dev* 65 Suppl: S3–S18.
- Koning N, Kessen SFM, Van Der Voorn JP, *et al* (2015). Human Milk Blocks DC-SIGN–Pathogen Interaction via MUC1. *Front Immunol* 6.
- Koplin J, Allen K, Gurrin L, Osborne N, Tang MLK, Dharmage S (2008). Is caesarean delivery associated with sensitization to food allergens and IgE-mediated food allergy: a systematic review. *Pediatr Allergy Immunol* 19: 682–687.
- Koskinen MT, Holopainen J, Pyörälä S, *et al* (2009). Analytical specificity and sensitivity of a real-time polymerase chain reaction assay for identification of bovine mastitis pathogens. *J Dairy Sci* 92: 952–959.
- Koskinen MT, Wellenberg GJ, Sampimon OC, *et al* (2010). Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *J Dairy Sci* 93: 5707–5715.
- Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3: a010306.
- Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, Schubert S (2013). MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics Clin Appl* 7: 767–778.
- Kramer MS, Chalmers B, Hodnett ED, *et al* (2001). Promotion of breastfeeding intervention trial (PROBIT): a randomized trial in the Republic of Belarus. *JAMA* 285: 413–420.
- Krzysciak W, Pluskwa KK, Jurczak A, Koscielniak D (2013). The

- pathogenicity of the *Streptococcus* genus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32: 1361–1376.
- Kuehn JS, Gorden PJ, Munro D, *et al* (2013). Bacterial community profiling of milk samples as a means to understand culture-negative bovine clinical mastitis. *PLoS ONE* 8: e61959.
- Kumar R, Indrayan A (2011). Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers. *Indian Pediatr* 48: 277–287.
- Kumar M, Kalke E (2012). Tongue-tie, breastfeeding difficulties and the role of frenotomy. *Acta Paediatr* 101: 687–689.
- Kumar R, Yadav BR, Anand SK, Singh RS (2011). Molecular surveillance of putative virulence factors and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from intra-mammary infections of river buffaloes. *Microb Pathog* 51: 31–38.
- Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S (2000). Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr* 20: 699–722.
- Kushwaha RS, Adjogaste J, Isgar B, Hale M, Catchpole C (2002). Mastitis due to *Salmonella paratyphi* A. *The Breast* 11: 102–103.
- Kvist LJ (2010). Toward a clarification of the concept of mastitis as used in empirical studies of breast inflammation during lactation. *J Hum Lact* 26: 53–59.
- Kvist LJ (2013). Re-examination of old truths: replication of a study to measure the incidence of lactational mastitis in breastfeeding women. *Int Breastfeed J* 8: 2.
- Kvist LJ, Larsson BW, Hall-Lord ML, Steen A, Schalén C (2008). The role of bacteria in lactational mastitis and some considerations of the use of antibiotic treatment. *Int Breastfeed J* 3: 6.
- Labiner-Wolfe J, Fein SB, Shealy KR, Wang C (2008). Prevalence of breast milk expression and associated factors. *Pediatrics* 122 Suppl 2: S63–68.
- Lai CC, Wang JY, Lin SH, *et al* (2011). Catheter-related bacteraemia and infective endocarditis caused by *Kocuria* species. *Clin Microbiol Infect* 17: 190–192.
- LaMarca HL, Rosen JM (2008). Hormones and mammary cell fate-What will I become when I grow up? *Endocrinology* 149: 4317–4321.
- Lambe M, Johansson ALV, Altman D, Eloranta S (2009). Mastitis and the risk of breast cancer. *Epidemiology* 20: 747–751.
- Langa S, Maldonado-Barragán A, Delgado S, *et al* (2012). Characterization of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a strain isolated from human milk: from genotype to phenotype. *Appl Microbiol Biotechnol* 94: 1279–1287.
- Larkin EA, Carman RJ, Krakauer T, Stiles BG (2009). *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. *Curr Med Chem* 16: 4003–4019.
- Larsen HD, Aarestrup FM, Jensen NE (2002). Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Vet Microbiol* 85: 61–67.
- Larsen E, Celi A, Gilbert GE, *et al* (1989). PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* 59: 305–312.
- Latuga MS, Stuebe A, Seed PC (2014). A review of the source and function of microbiota in breast milk. *Semin Reprod Med* 32: 68–73.
- Lau SKP, Tang BSF, Teng JLL, *et al* (2014). Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry for identification of clinically significant bacteria that are difficult to identify in clinical laboratories. *J Clin Pathol* 67: 361–366.
- Lawrence R, Lawrence RM (2008). Approach to breast-feeding. In: *Nutrition in Pediatrics: basic science*

- and clinical applications. 4rd Edition. Duggan C, Watkins JB, Walker WA (Eds). BC Decker Inc, Canada, pp. 363-375.
- Lawrence RA, Lawrence RM (2011). *Breastfeeding: A Guide for the Medical Professional - Expert Consult*. 7th Edition. Elsevier/Mosby, St. Louis.
- Le Doare K, Kampmann B (2014). Breast milk and Group B streptococcal infection: vector of transmission or vehicle for protection? *Vaccine* 32: 3128–3132.
- Le Flèche-Matéos A, Berthet N, Lomprez F, et al (2012). Recurrent breast abscesses due to *Corynebacterium kroppenstedtii*, a human pathogen uncommon in Caucasian women. *Case Rep Infect Dis* 2012: 1–5.
- Le Maréchal C, Seyffert N, Jardin J, et al (2011). Molecular basis of virulence in *Staphylococcus aureus* mastitis. *PLoS ONE* 6: e27354.
- Lemon SC, Roy J, Clark MA, Friedmann PD, Rakowski W (2003). Classification and regression tree analysis in public health: methodological review and comparison with logistic regression. *Ann Behav Med* 26: 172–181.
- Li H, Ye R, Pei L, Ren A, Zheng X, Liu J (2014). Caesarean delivery, caesarean delivery on maternal request and childhood overweight: a Chinese birth cohort study of 181,380 children. *Pediatr Obes* 9: 10–16.
- Li R, Fein SB, Chen J, Grummer-Strawn LM (2008). Why mothers stop breastfeeding: mothers' self-reported reasons for stopping during the first year. *Pediatrics* 122 Suppl 2: S69–76.
- Limaïem F, Korbi S, Tlili T, et al (2012). Idiopathic granulomatous mastitis mimicking breast cancer: report of two cases. *Pathologica* 104: 105–108.
- Lin Y-C, Peterson ML (2010). New insights into the prevention of staphylococcal infections and toxic shock syndrome. *Expert Rev Clin Pharmacol* 3: 753–767.
- Lind JN, Perrine CG, Li R (2014). Relationship between use of labor pain medications and delayed onset of lactation. *J Hum Lact* 30: 167–173.
- Liu B, Newburg DS (2013). Human milk glycoproteins protect infants against human pathogens. *Breastfeed Med* 8: 354–362.
- Llewelyn M, Cohen J (2002). Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. *Lancet Infect Dis* 2: 156–162.
- Lo JCY, Lange D (2015). Current and potential applications of host-defense peptides and proteins in urology. *Biomed Res Int* 2015: 189016.
- Lopez C, Ménard O (2011). Human milk fat globules: polar lipid composition and in situ structural investigations revealing the heterogeneous distribution of proteins and the lateral segregation of sphingomyelin in the biological membrane. *Colloids Surf B Biointerfaces* 83: 29–41.
- López MF (2009). Anatomía del amamantamiento. En: *Manual de Lactancia Materna. De la teoría a la práctica*. Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría. Editorial Médica Panamericana, Madrid, pp. 55-60.
- López Roa P, Sánchez Carrillo C, Marín M, Romero F, Cercenado E, Bouza E (2013). Value of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight for routine identification of viridans group streptococci causing bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect* 19: 438–444.
- Lou Z, Zeng G, Huang L, Wang Y, Zhou L, Kavanagh KF (2014). Maternal reported indicators and causes of insufficient milk supply. *J Hum Lact* 30: 466–473.
- Loubert C, Hinova A, Fernando R (2011). Update on modern neuraxial analgesia in labour: a review of the literature of the last 5 years. *Anaesthesia* 66: 191–212.
- Lowy FD (2011). How *Staphylococcus aureus* adapts to its host. *N Engl J Med* 364: 1987–1990.
- Lüthje P, Schwarz S (2006). Antimicrobial

- resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J Antimicrob Chemother* 57: 966–969.
- Ma ES, Wong CL, Lai KT, Chan EC, Yam WC, Chan AC (2005). *Kocuria kristinae* infection associated with acute cholecystitis. *BMC Infectious Diseases* 5: 60.
- Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, et al (2002). Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1147–1152.
- Ma Z, Guan Q, Ye C, Zhang C, Foster JA, Forney LJ (2015). Network analysis suggests a potentially ‘evil’ alliance of opportunistic pathogens inhibited by a cooperative network in human milk bacterial communities. *Sci Rep* 5: 8275.
- MacFaddin JF (Ed.) (2000). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Madlon-Kay DJ (1986). ‘Witch’s milk’. Galactorrhea in the newborn. *Am J Dis Child* 140: 252–253.
- Makino H, Kushiro A, Ishikawa E, et al (2011). Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol* 77: 6788–6793.
- Makino H, Martin R, Ishikawa E, et al (2015). Multilocus sequence typing of bifidobacterial strains from infant’s faeces and human milk: are bifidobacteria being sustainably shared during breastfeeding? *Benef Microbes* 6: 563–572.
- Maldonado J, Cañabate F, Sempere L, et al (2012). Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54: 55–61.
- Maldonado-Lobón JA, Gil-Campos M, Maldonado J, et al (2015). Long-term safety of early consumption of *Lactobacillus fermentum* CECT5716: A 3-year follow-up of a randomized controlled trial. *Pharmacol Res* 95-96: 12–19.
- Mallick D, Saha M, Chakrabarti S, Chakrabarty J (2014). Tubercular breast abscess-a diagnostic dilemma. *J Nepal Health Res Counc* 12: 144–146.
- Mann JJ, Ellis SP, Waternaux CM, et al (2008). Classification trees distinguish suicide attempters in major psychiatric disorders: a model of clinical decision making. *J Clin Psychiatry* 69: 23–31.
- Marín ML, Arroyo R, Jiménez E, Gómez A, Fernández L, Rodríguez JM (2009). Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 49: 343–348.
- Marinopoulos S, Laurantou D, Gatzionis T, Dimitrakakis C, Papaspyrou I, Antsaklis A (2012). Breast tuberculosis: Diagnosis, management and treatment. *Int J Surg Case Rep* 3: 548–550.
- Marshall BR, Hepper JK, Zirbel CC (1975). Sporadic puerperal mastitis. An infection that need not interrupt lactation. *JAMA* 233: 1377–1379.
- Martín R, Heilig GHJ, Zoetendal EG, et al (2007). Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res Microbiol* 158: 31–37.
- Martín R, Heilig GHJ, Zoetendal EG, Smidt H, Rodríguez JM (2007). Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *J Appl Microbiol* 103: 2638–2644.
- Martín R, Jiménez E, Heilig H, et al (2009). Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 75: 965–969.

- Martín R, Langa S, Reviriego C, *et al* (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics* 143: 754–758.
- Martín R, Langa S, Reviriego C, *et al* (2004). The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci Technol* 15: 121–127.
- Martín R, Olivares M, Pérez M, *et al* (2010). Identification and evaluation of the probiotic potential of lactobacilli isolated from canine milk. *Vet J* 185: 193–198.
- Martín V, Cárdenas N, Jiménez E, Maldonado A, Rodríguez JM, Fernández L (2013). Genome sequence of *Lactobacillus gastricus* PS3, a strain isolated from human milk. *Genome Announc* 1: e00489-13.
- Martín V, Maldonado-Barragán A, Moles L, *et al* (2012). Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Hum Lact* 28: 36–44.
- Martín V, Mañes-Lázaro R, Rodríguez JM, Maldonado-Barragán A (2011). *Streptococcus lactarius* sp. nov., isolated from breast milk of healthy women. *Int J Syst Evol Microbiol* 61: 1048–1052.
- Martinez de Tejada B (2014). Antibiotic use and misuse during pregnancy and delivery: benefits and risks. *Int J Environ Res Public Health* 11: 7993–8009.
- Martinez de Tejada B, Pfister RE, Renzi G, *et al* (2011). Intrapartum Group B streptococcus detection by rapid polymerase chain reaction assay for the prevention of neonatal sepsis. *Clin Microbiol Infect* 17: 1786–1791.
- Mathelin C, Riegel P, Chenard M-P, Brettes J-P (2005). Association of corynebacteria with granulomatous mastitis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 119: 260–261.
- Matheson I, Aursnes I, Horgen M, Aabø O, Melby K (1988). Bacteriological findings and clinical symptoms in relation to clinical outcome in puerperal mastitis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 67: 723–726.
- Matsumiya Y, Kato N, Watanabe K, Kato H (2002). Molecular epidemiological study of vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Infect Chemother* 8: 43–49.
- Mazón A, Salvo MS, Ezcurra R (2000). Resultados del programa de prevención de la infección neonatal por estreptococo del grupo B. *Prog Obstet Ginecol* 43: 233–236.
- McGowan JP, Shah SS (2000). Prevention of perinatal HIV transmission during pregnancy. *J Antimicrob Chemother* 46: 657–668.
- McGuire MK, McGuire MA (2015). Human milk: mother nature's prototypical probiotic food? *Adv Nutr* 6: 112–123.
- McManaman JL, Reyland ME, Thrower EC (2006). Secretion and fluid transport mechanisms in the mammary gland: comparisons with the exocrine pancreas and the salivary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 11: 249–268.
- Mediano P, Fernández L, Rodríguez JM, Marín M (2014). Case-control study of risk factors for infectious mastitis in Spanish breastfeeding women. *BMC Pregnancy Childbirth* 14: 195.
- Meier-Abt F, Bentires-Alj M (2014). How pregnancy at early age protects against breast cancer. *Trends Mol Med* 20: 143–153.
- Melchior MB, Vaarkamp H, Fink-Gremmels J (2006). Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J* 171: 398–407.
- Mendoza-Olazarán S, Morfin-Otero R, Rodríguez-Noriega E, *et al* (2013). Microbiological and molecular characterization of *Staphylococcus hominis* isolates from blood. *PLoS ONE* 8: e61161.
- Meng X-H, Huang Y-X, Rao D-P, Zhang Q, Liu Q (2013). Comparison of three data mining models for predicting diabetes or prediabetes by risk factors. *Kaohsiung J Med Sci* 29: 93–99.



- Miedzybrodzki B, Miller M (2013). A lactating woman presenting with puerperal pneumococcal mastitis: a case report. *J Med Case Rep* 7: 114.
- Mihrshahi S, Battistutta D, Magarey A, Daniels LA (2011). Determinants of rapid weight gain during infancy: baseline results from the NOURISH randomised controlled trial. *BMC Pediatr* 11: 99.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Subdirección General de Información Sanitaria e Innovación (2013). *Evolución de la Tasa de Cesáreas en los Hospitales Generales del Sistema Nacional de Salud: Años 2001-2011*. Informes Breves CMBD. N° 1. Madrid. [<http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/cmbdhome.htm>] Consultado: 9/9/2015.
- Miragaia M, Couto I, de Lencastre H (2005). Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *Microb Drug Resist* 11: 83–93.
- Mitchell J (2011). *Streptococcus mitis*: walking the line between commensalism and pathogenesis. *Mol Oral Microbiol* 26: 89–98.
- Moazzez A, Kelso RL, Towfigh S, Sohn H, Berne TV, Mason RJ (2007). Breast abscess bacteriologic features in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemics. *Arch Surg* 142: 881–884.
- Moles L, Escribano E, de Andrés J, et al (2015). Administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two strains isolated from human milk, to very low and extremely low birth weight preterm infants: a pilot study. *J Immunol Res* 2015: 538171.
- Moles L, Manzano S, Fernández L, et al (2015). Bacteriological, biochemical, and immunological properties of colostrum and mature milk from mothers of extremely preterm infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 60: 120–126.
- Molina Arias M, Ochoa Sangrador C (2014). Estudios observacionales (III). Estudios de casos y controles. *Evid Pediatr* 10: 33.
- Møller UK, Streym S við, Mosekilde L, Rejnmark L (2011). Changes in bone mineral density and body composition during pregnancy and postpartum. A controlled cohort study. *Osteoporos Int* 23: 1213–1223.
- Monds RD, O'Toole GA (2009). The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol* 17: 73–87.
- Monks J, McManaman JL (2013). Secretion and fluid transport mechanisms in the mammary gland. In: *Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk*. Human Health Handbooks. Volume 5. Zibadi S, Watson RR, Preedy VR (Eds). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, pp. 35–56.
- Montgomery A, Hale TW, Academy Of Breastfeeding Medicine (2012). ABM clinical protocol #15: analgesia and anesthesia for the breastfeeding mother, revised 2012. *Breastfeed Med* 7: 547–553.
- Morales DK, Hogan DA (2010). *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog* 6: e1000886.
- Morino C, Winn SM (2007). Raynaud's phenomenon of the nipples: an elusive diagnosis. *J Hum Lact* 23: 191–193.
- Morland-Schultz K, Hill PD (2005). Prevention of and therapies for nipple pain: a systematic review. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 34: 428–437.
- Morosini MI, Cercenado E, Ardanuy C, Torres C (2012). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos grampositivos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30: 325–332.
- Morrill JF, Heinig MJ, Pappagianis D, Dewey KG (2005). Risk factors for mammary candidosis among lactating women. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 34: 37–45.

- Morris SK, Nag S, Suh KN, Evans GA (2004). Recurrent chronic ambulatory peritoneal dialysis-associated infection due to *Rothia dentocariosa*. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 15: 171–173.
- Mueller NT, Whyatt R, Hoepner L, *et al* (2015). Prenatal exposure to antibiotics, cesarean section and risk of childhood obesity. *Int J Obes (Lond)* 39: 665–670.
- Muller R, Möckel M (2008). Logistic regression and CART in the analysis of multimarker studies. *Clin Chim Acta* 394: 1–6.
- Murakami M, Dorschner RA, Stern LJ, Lin KH, Gallo RL (2005). Expression and secretion of cathelicidin antimicrobial peptides in murine mammary glands and human milk. *Pediatr Res* 57: 10–15.
- Musilova S, Rada V, Vlkova E, Bunesova V (2014). Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. *Benef Microbes* 5: 273–283.
- Muszer M, Noszczyńska M, Kasperkiewicz K, Skurnik M (2015). Human microbiome: when a friend becomes an enemy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 63: 287–298.
- Namvar AE, Bastarahang S, Abbasi N, *et al* (2014). Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hyg Infect Control* 9: Doc23.
- Naraynsingh V, Hariharan S, Dan D, Harnarayan P, Teelucksingh S (2010). Conservative management for idiopathic granulomatous mastitis mimicking carcinoma: case reports and literature review. *Breast Dis* 31: 57–60.
- Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 29: 524–534.
- Neu J, Rushing J (2011). Cesarean versus vaginal delivery: long-term infant outcomes and the hygiene hypothesis. *Clin Perinatol* 38: 321–331.
- Neville MC (1998). Milk secretion: an overview. [[https://www.health-e-learning.com/articles/Neville\\_MILK\\_SECRETION\\_2008.pdf](https://www.health-e-learning.com/articles/Neville_MILK_SECRETION_2008.pdf)]. Consultado: 9/9/2015.
- Neville MC (1999). Physiology of lactation. *Clin Perinatol* 26: 251–279.
- Neville MC (2009). Introduction: tight junctions and secretory activation in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14: 269–270.
- Neville MC, Allen JC, Watters C (1983). The mechanisms of milk secretion. In: *Lactation: Physiology, Nutrition and Breast-Feeding*. Neville MC, Neifert MR (Eds.). Plenum Press, New York.
- Neville MC, Morton J (2001). Physiology and endocrine changes underlying human lactogenesis II. *J Nutr* 131: 3005S–3008S.
- Neville MC, Morton J, Umemura S (2001). Lactogenesis. The transition from pregnancy to lactation. *Pediatr Clin North Am* 48: 35–52.
- Newburg DS (2013). Glycobiology of human milk. *Biochemistry Mosc* 78: 771–785.
- Nomura F (2015). Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochim Biophys Acta* 1854: 528–537.
- Nooh MM, El-Gengehi N, Kansal R, David CS, Kotb M (2007). HLA transgenic mice provide evidence for a direct and dominant role of HLA class II variation in modulating the severity of streptococcal sepsis. *J Immunol* 178: 3076–3083.
- Nyqvist KH, Häggkvist A-P, Hansen MN, *et al* (2013). Expansion of the Baby-Friendly Hospital Initiative *Ten Steps to Successful Breastfeeding* into neonatal intensive care: Expert Group Recommendations. *J Hum Lact* 29: 300–309.
- Nyqvist KH, Sjöden PO, Ewald U (1999). The development of preterm infants' breastfeeding behavior. *Early Hum Dev* 55: 247–264.

- Nzegwu MA, Agu KA, Amaraegbulam PI (2007). Idiopathic granulomatous mastitis lesion mimicking inflammatory breast cancer. *CMAJ* 176: 1822.
- Obermann-Borst SA, Eilers PHC, Tobi EW, *et al* (2013). Duration of breastfeeding and gender are associated with methylation of the LEPTIN gene in very young children. *Pediatr Res* 74: 344–349.
- O'Brien J, Martinson H, Durand-Rougely C, Schedin P (2012). Macrophages are crucial for epithelial cell death and adipocyte repopulation during mammary gland involution. *Development* 139: 269–275.
- Oddy WH (2013). Transforming growth factor- $\beta$  in milk. In: *Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk*. Human Health Handbooks. Volume 5. Zibadi S, Watson RR, Preedy VR (Eds). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, pp. 417–436.
- Oddy WH, Rosales F (2010). A systematic review of the importance of milk TGF- $\beta$  on immunological outcomes in the infant and young child. *Pediatr Allergy Immunol* 21: 47–59.
- Odom EC, Li R, Scanlon KS, Perrine CG, Grummer-Strawn L (2013). Reasons for earlier than desired cessation of breastfeeding. *Pediatrics* 131: e726–732.
- Oftedal OT (2002). The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7: 225–252.
- Oğuz S, Işık S, Çakır Güngör AN, Şeker M, Ogretmen Z (2014). Protective efficacy of olive oil for sore nipples during nursing. *J Family Med Community Health* 1(4): 1021.
- Ohlsson A, Shah VS (2014). Intrapartum antibiotics for known maternal Group B streptococcal colonization. *Cochrane Database Syst Rev* 6: CD007467.
- Oikonomou G, Bicalho ML, Meira E, *et al* (2014). Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. *PLoS ONE* 9: e85904.
- Oikonomou G, Machado VS, Santisteban C, Schukken YH, Bicalho RC (2012). Microbial diversity of bovine mastitic milk as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. *PLoS ONE* 7: e47671.
- Olechnowicz J, Jaśkowski JM (2012). Somatic cells count in cow's bulk tank milk. *J Vet Med Sci* 74: 681–686.
- Olender A (2013). Antibiotic resistance and detection of the most common mechanism of resistance (MLSB) of opportunistic *Corynebacterium*. *Chemotherapy* 59: 294–306.
- Olivares M, Albrecht S, De Palma G, *et al* (2015). Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *Eur J Nutr* 54: 119–128.
- Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, *et al* (2007). Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* 23: 254–260.
- Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, *et al* (2006). Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol* 118: 133–140.
- Oliver SP, Murinda SE (2012). Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 28: 165–185.
- OMS (2010). *La alimentación del lactante y del niño pequeño*. Capítulo Modelo para libros de texto dirigidos a estudiantes de medicina y otras ciencias de la salud. ISBN: 978-92-75-33094-4. Geneva, Switzerland.
- Ong KK, Loos RJF (2006). Rapid infancy weight gain and subsequent obesity: systematic reviews and hopeful suggestions. *Acta Paediatr* 95: 904–908.
- Onni T, Sanna G, Larsen J, Tola S (2011). Antimicrobial susceptibilities and population structure of *Staphylococcus epidermidis* associated with ovine mastitis. *Vet Microbiol* 148: 45–50.
- Ortiz Perez A (2009). *Caracterización de*

- los mecanismos de resistencia a macrólidos en difteromorfos aislados en muestras clínicas. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. ISBN: 9788469276099.
- Ortiz-Pérez A, Martín-De-Hijas NZ, Esteban J, Fernández-Natal MI, García-Cía JJ, Fernández-Roblas R (2010). High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. *Microb Drug Resist* 16: 273–277.
- O’Sullivan S, Keith MP (2011). Raynaud phenomenon of the nipple: a rare finding in rheumatology clinic. *J Clin Rheumatol* 17: 371–372.
- O’Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54: 49–79.
- Otto M (2012). Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin Immunopathol* 34: 201–214.
- Otto M (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med* 64: 175–188.
- Otto M (2014). *Staphylococcus epidermidis* pathogenesis. *Methods Mol Biol* 1106: 17–31.
- Owens MB, Hill AD, Hopkins AM (2013). Ductal barriers in mammary epithelium. *Tissue Barriers* 1: e25933.
- Pacheco AR, Barile D, Underwood MA, Mills DA (2015). The impact of the milk glycobiome on the neonate gut microbiota. *Annu Rev Anim Biosci* 3: 419–445.
- Page SM, McKenna DS (2006). Vasospasm of the nipple presenting as painful lactation. *Obstet Gynecol* 108: 806–808.
- Palmer RJ, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE (2003). Coaggregation-mediated interactions of streptococci and actinomyces detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol* 185: 3400–3409.
- Pansky B (1982). Development of the mammary glands. In: *Review of Medical Embriology*. Embryome Sciences, Inc. Alameda, California, USA.
- Papuzinski Aguayo C, Martínez Lomakin F (2014). Case-control studies-The retrospective perspective. *Medwave* 14: e5925–e5925.
- Park JY, Fox LK, Seo KS, *et al* (2011). Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative staphylococci isolated from bovine intramammary infections. *Vet Microbiol* 147: 149–154.
- Patel R (2015). MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem* 61: 100–111.
- Patel GK, Finlay AY (2003). Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol* 4: 165–175.
- Patti M-E (2013). Intergenerational programming of metabolic disease: evidence from human populations and experimental animal models. *Cell Mol Life Sci* 70: 1597–1608.
- Paviour S, Musaad S, Roberts S, *et al* (2002). *Corynebacterium* species isolated from patients with mastitis. *Clin Infect Dis* 35: 1434–1440.
- Pereira FA, Mudgil AV, Macias ES, Karsif K (2012). Idiopathic granulomatous lobular mastitis. *Int J Dermatol* 51: 142–151.
- Peres AG, Stegen C, Li J, *et al* (2015). Uncoupling of pro- and anti-inflammatory properties of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 83: 1587–1597.
- Perez PF, Doré J, Leclerc M, *et al* (2007). Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 119: e724–732.
- Peters MJ, Heyderman RS, Hatch DJ, Klein NJ (1997). Investigation of platelet-neutrophil interactions in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods* 209: 125–135.
- Peters RPH, Twisk JWR, van Agtmael MA, Groeneveld ABJ (2006). The role of procalcitonin in a decision tree for

- prediction of bloodstream infection in febrile patients. *Clin Microbiol Infect* 12: 1207–1213.
- Phuektes P, Browning GF, Anderson G, Mansell PD (2003). Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis* in bulk milk samples. *J Dairy Res* 70: 149–155.
- Pieterse R, Todorov SD (2010). Bacteriocins - exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. *Braz J Microbiol* 41: 542–562.
- Piette A, Verschraegen G (2009). Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Vet Microbiol* 134: 45–54.
- Pilla R, Schwarz D, König S, Piccinini R (2012). Microscopic differential cell counting to identify inflammatory reactions in dairy cow quarter milk samples. *J Dairy Sci* 95: 4410–4420.
- Piper ME, Loh W-Y, Smith SS, Japuntich SJ, Baker TB (2011). Using decision tree analysis to identify risk factors for relapse to smoking. *Subst Use Misuse* 46: 492–510.
- Pirofski LA, Casadevall A (2012). Q and A: What is a pathogen? A question that begs the point. *BMC Biology* 10: 6.
- Pirotta MV, Garland SM (2006). Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. *J Clin Microbiol* 44: 3213–3217.
- Podgorelec V, Kokol P, Stiglic B, Rozman I (2002). Decision trees: an overview and their use in medicine. *J Med Syst* 26: 445–463.
- Podkowik M, Park JY, Seo KS, Bystron J, Bania J (2013). Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. *Int J Food Microbiol* 163: 34–40.
- Poulsen K, Reinholdt J, Jespersgaard C, *et al* (1998). A comprehensive genetic study of streptococcal immunoglobulin A1 proteases: evidence for recombination within and between species. *Infect Immun* 66: 181–190.
- Prathima S, Kalyani R, Parimala S (2014). Primary tubercular mastitis masquerading as malignancy. *J Nat Sci Biol Med* 5: 184–186.
- Prieto PA (2012). Profiles of human milk oligosaccharides and production of some human milk oligosaccharides in transgenic animals. *Adv Nutr* 3: 456S–464S.
- Purdy S, Saranathan R, Prashanth K, *et al* (2013). The expanding spectrum of human infections caused by *Kocuria* species: a case report and literature review. *Emerg Microbes Infect* 2: e71.
- Pyörälä S (2003). Indicators of inflammation in the diagnosis of mastitis. *Vet Res* 34: 565–578.
- Pyörälä S, Taponen S (2009). Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol* 134: 3–8.
- Qi Y, Zhang Y, Fein S, Wang C, Loyo-Berrios N (2014). Maternal and breast pump factors associated with breast pump problems and injuries. *J Hum Lact* 30: 62–72.
- Quigley MA, Kelly YJ, Sacker A (2007). Breastfeeding and hospitalization for diarrheal and respiratory infection in the United Kingdom Millennium Cohort Study. *Pediatrics* 119: e837–842.
- Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, *et al* (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* 37: 664–698.
- Raad I, Hanna H, Maki D (2007). Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect Dis* 7: 645–657.
- Ramanan P, Barreto JN, Osmon DR, Tosh PK (2014). *Rothia* bacteremia: a 10-year experience at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota. *J Clin Microbiol* 52: 3184–3189.
- Ramsay D, Kent J, Hartmann R, Hartman P (2005). Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound

- imaging. *J Anat* 206: 525–534.
- Ramsay DT, Kent JC, Owens RA, Hartmann PE (2004). Ultrasound imaging of milk ejection in the breast of lactating women. *Pediatrics* 113: 361–367.
- Rappuoli R, Black S (Eds.) (2013). *Prevention of perinatal group B streptococcal disease through maternal immunization*. An update of the progresses in GBS disease prevention, based on the *Streptococcus* Scientific Exchange Meeting. July, 2012. Siena, Italy. Vaccine 31 (Supplement 4): D1–D72.
- Rasmussen KM, Geraghty SR (2011). The quiet revolution: breastfeeding transformed with the use of breast pumps. *Am J Public Health* 101: 1356–1359.
- Rasmussen L-BW, Hansen DH, Kaestel P, Michaelsen KF, Friis H, Larsen T (2008). Milk enzyme activities and subclinical mastitis among women in Guinea-Bissau. *Breastfeed Med* 3: 215–219.
- Raynaud M (1888). On local asphyxic and symmetrical gangrene of the extremities and new researches in the nature and treatment of local asphyxia of the extremities. Selected monographs, Vol 121. Sydenham Society, London.
- Reddy P, Qi C, Zembower T, Noskin GA, Bolon M (2007). Postpartum mastitis and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infect Dis* 13: 298–301.
- Redondo A, Sáez M, Oliva P, Soler M, Arias A (2013). Variabilidad en el porcentaje de cesáreas y en los motivos para realizarlas en los hospitales españoles. *Gac Sanit* 27: 258–262.
- Reed JR, Schwertfeger KL (2010). Immune cell location and function during post-natal mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15: 329–339.
- Regan JA, Klebanoff MA, Nugent RP (1991). The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Obstet Gynecol* 77: 604–610.
- Renshaw AA, Derhagopian RP, Gould EW (2011). Cystic neutrophilic granulomatous mastitis: an underappreciated pattern strongly associated with gram-positive bacilli. *Am J Clin Pathol* 136: 424–427.
- Renz DM, Baltzer PAT, Böttcher J, et al (2008). Magnetic resonance imaging of inflammatory breast carcinoma and acute mastitis. A comparative study. *Eur Radiol* 18: 2370–2380.
- Renz-Polster H, David MR, Buist AS, et al (2005). Caesarean section delivery and the risk of allergic disorders in childhood. *Clin Exp Allergy* 35: 1466–1472.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, et al (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2: 361–367.
- Reysenbach AL, Giver LJ, Wickham GS, Pace NR (1992). Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* 58: 3417–3418.
- Rich M, Deighton L, Roberts L (2005). Clindamycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Vet Microbiol* 111: 237–240.
- Richard-Miceli C, Criswell LA (2012). Emerging patterns of genetic overlap across autoimmune disorders. *Genome Med* 4: 6.
- Riegel P, Liégeois P, Chenard M-P, Mathelin C, Monteil H (2004). Isolations of *Corynebacterium kroppenstedtii* from a breast abscess. *Int J Med Microbiol* 294: 413–416.
- Righard L (1998). Are breastfeeding problems related to incorrect breastfeeding technique and the use of pacifiers and bottles? *Birth* 25: 40–44.
- Risnes KR, Belanger K, Murk W, Bracken MB (2011). Antibiotic exposure by 6 months and asthma and allergy at 6 years: Findings in a cohort of 1,401 US children. *Am J Epidemiol* 173: 310–318.

- Rivas-Santiago B, Serrano CJ, Enciso-Moreno JA (2009). Susceptibility to infectious diseases based on antimicrobial peptide production. *Infect Immun* 77: 4690–4695.
- Rodríguez JM (2012). Microbiota intestinal y vaginal. En: *Consenso en Probióticos Vaginales*. Beltrán DA, Guerra JA (Eds.). EDIMSA, Madrid, pp. 30–36.
- Rodríguez JM (2014). The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv Nutr* 5: 779–784.
- Rodríguez JM (2015). Probióticos: del laboratorio al consumidor. *Nutr Hosp* 31: 33–47.
- Rodríguez JM, Dalmau J (2007a). Probióticos para el binomio madre-hijo (I). *Acta Pediatr Esp* 65: 452–457.
- Rodríguez JM, Dalmau J (2007b). Probióticos para el binomio madre-hijo (y II). *Acta Pediatr Esp* 65: 513–518.
- Rodríguez J, Jiménez E, Merino V, et al (2008). Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. *Acta Pediatr Esp* 66: 77–82.
- Rogers KL, Fey PD, Rupp ME (2009). Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am* 23: 73–98.
- Romero R, Korzeniewski SJ (2013). Are infants born by elective cesarean delivery without labor at risk for developing immune disorders later in life? *Am J Obstet Gynecol* 208: 243–246.
- Roncada P, Stipetic LH, Bonizzi L, Burchmore RJS, Kennedy MW (2013). Proteomics as a tool to explore human milk in health and disease. *J Proteomics* 88: 47–57.
- Rosenthal M, Goldberg D, Aiello A, Larson E, Foxman B (2011). Skin microbiota: microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infect Genet Evol* 11: 839–848.
- Rouw E, Hormann E, Scherbaum V (2015). The high cost of half-hearted breastfeeding promotion in Germany. *Int Breastfeed J* 9: 22.
- Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (2012). *The prevention of early onset neonatal group B streptococcal disease*. RCOG Green-top Guideline No. 36. CCOG, London. [<https://www.rcog.org.uk/en/guidelines-research-services/guidelines/gtg36/>] Consultado: 9/9/2015.
- Royston P, Altman DG, Sauerbrei W (2006). Dichotomizing continuous predictors in multiple regression: a bad idea. *Stat Med* 25: 127–141.
- Rudloff S, Stefan C, Pohlentz G, Kunz C (2002). Detection of ligands for selectins in the oligosaccharide fraction of human milk. *Eur J Nutr* 41: 85–92.
- Rupp R, Boichard D (2003). Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Vet Res* 34: 671–688.
- Russo J, Russo IH (2004). Development of the human breast. *Maturitas* 49: 2–15.
- Sabageh D, Amao EA, Ayo-Aderibigbe AA, Sabageh AO (2015). Tuberculous mastitis simulating carcinoma of the breast in a young Nigerian woman: a case report. *Pan Afr Med J* 21: 125.
- Saegerman C, Speybroeck N, Roels S, Vanopdenbosch E, Thiry E, Berkvens D (2004). Decision support tools for clinical diagnosis of disease in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. *J Clin Microbiol* 42: 172–178.
- Sahal G, Bilkay IS (2014). Multi drug resistance in strong biofilm forming clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Braz J Microbiol* 45: 539–544.
- Salminen S, Gibson GR, McCartney AL, Isolauri E (2004). Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut* 53: 1388–1389.
- Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, et al (2014). Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol* 12: 87.
- Sánchez P, Buezas V, Maestre JR (2001). Infección por *Staphylococcus lugdunensis*: presentación de trece casos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*

- 19: 475–478.
- Savage W (2000). The caesarean section epidemic. *J Obstet Gynaecol* 20: 223–225.
- Savijoki K, Iivanainen A, Siljamäki P, *et al* (2014). Genomics and proteomics provide new insight into the commensal and pathogenic lifestyles of bovine- and human-associated *Staphylococcus epidermidis* strains. *J Proteome Res* 13: 3748–3762.
- Savini V, Catavittello C, Bianco A, Balbinot A, D'Antonio D (2009). Epidemiology, pathogenicity and emerging resistances in *Staphylococcus pasteurii*: from mammals and lampreys, to man. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 4: 123–129.
- Savini V, Catavittello C, Masciarelli G, *et al* (2010). Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. *J Med Microbiol* 59: 1395–1402.
- Scaccabarozzi L, Locatelli C, Pisoni G, *et al* (2011). Short communication: Epidemiology and genotyping of *Candida rugosa* strains responsible for persistent intramammary infections in dairy cows. *J Dairy Sci* 94: 4574–4577.
- Schabauer L, Wenning M, Huber I, Ehling-Schulz M (2014). Novel physico-chemical diagnostic tools for high throughput identification of bovine mastitis associated gram-positive, catalase-negative cocci. *BMC Vet Res* 10: 156.
- Schoenfeld EM, McKay MP (2010). Mastitis and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): the calm before the storm? *J Emerg Med* 38: e31–34.
- Schoenfelder SMK, Lange C, Eckart M, Hennig S, Kozytska S, Ziebuhr W (2010). Success through diversity - how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *Int J Med Microbiol* 300: 380–386.
- Schulthess B, Brodner K, Bloemberg GV, Zbinden R, Bottger EC, Hombach M (2013). Identification of gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. *J Clin Microbiol* 51: 1834–1840.
- Scott JA, Binns CW, Oddy WH, Graham KI (2006). Predictors of breastfeeding duration: evidence from a cohort study. *Pediatrics* 117: e646–655.
- Scott JA, Robertson M, Fitzpatrick J, Knight C, Mulholland S (2008). Occurrence of lactational mastitis and medical management: A prospective cohort study in Glasgow. *Int Breastfeed J* 3: 21.
- Sears PM, McCarthy KK (2003). Diagnosis of mastitis for therapy decisions. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 19: 93–108.
- Section on Breastfeeding (2012). Breastfeeding and the use of human milk. Policy Statement from the American Academy of Pediatrics. *Pediatrics* 129: e827–841.
- Seo HRN, Na KY, Yim HE, *et al* (2012). Differential diagnosis in idiopathic granulomatous mastitis and tuberculous mastitis. *J Breast Cancer* 15: 111–118.
- Sethi N, Smith D, Korteque S, Ward VMM, Clarke S (2013). Benefits of frenulotomy in infants with ankyloglossia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 77: 762–765.
- Shang S, Fu J, Dong G, Hong W, Du L, Yu X (2003). Establishment and analysis of specific DNA patterns in 16S-23S rRNA gene spacer regions for differentiating different bacteria. *Chin Med J* 116: 129–133.
- Sheflin AM, Whitney AK, Weir TL (2014). Cancer-promoting effects of microbial dysbiosis. *Curr Oncol Rep* 16: 406.
- Shirliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA (2009). Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 299: 1–8.
- Sibley CD, Peirano G, Church DL (2012). Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infect Genet Evol* 12: 505–521.



- Silverman GJ, Goodyear CS (2006). Confounding B-cell defences: lessons from a staphylococcal superantigen. *Nat Rev Immunol* 6: 465–475.
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 6: 791.
- Singh S, Chhabra S, Yadav R, Duhan A (2011). Tuberculous mastitis: still a diagnostic dilemma. *J Glob Infect Dis* 3: 98–99.
- Singh R, Ray P, Das A, Sharma M (2010). Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother* 65: 1955–1958.
- Skevaki C, Pararas M, Kostelidou K, Tsakris A, Routsias JG (2015). Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. *Clin Exp Immunol* 180: 165–177.
- Smilowitz JT, O'Sullivan A, Barile D, German JB, Lönnerdal B, Slupsky CM (2013). The human milk metabolome reveals diverse oligosaccharide profiles. *J Nutr* 143: 1709–1718.
- Smith JP (2013). 'Lost milk?': Counting the economic value of breast milk in gross domestic product. *J Hum Lact* 29: 537–546.
- Smith DM, Peters TG, Donegan WL (1982). Montgomery's areolar tubercle. A light microscopic study. *Arch Pathol Lab Med* 106: 60–63.
- Smolenski G, Haines S, Kwan FY-S, et al (2007). Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach. *J Proteome Res* 6: 207–215.
- Solís G, de Los Reyes-Gavilan CG, Fernández N, Margolles A, Gueimonde M (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* 16: 307–310.
- Sommer F, Bäckhed F (2013). The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 11: 227–238.
- Soto A, Martin V, Jimenez E, Mader I, Rodriguez JM, Fernandez L (2014). *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in human breast milk: Influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 59: 78–88.
- Spencer JP (2008). Management of mastitis in breastfeeding women. *Am Fam Physician* 78: 727–731.
- Speziale P, Geoghegan JA (2015). Biofilm formation by staphylococci and streptococci: structural, functional, and regulatory aspects and implications for pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 5: 31.
- Stach CS, Herrera A, Schlievert PM (2014). Staphylococcal superantigens interact with multiple host receptors to cause serious diseases. *Immunol Res* 59: 177–181.
- Stackebrandt E, Koch C, Gvozdiak O, Schumann P (1995). Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int J Syst Bacteriol* 45: 682–692.
- Stafford I, Hernandez J, Laibl V, Sheffield J, Roberts S, Wendel G (2008). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients with puerperal mastitis requiring hospitalization. *Obstet Gynecol* 112: 533–537.
- Sтары CM, Lee YS, Balfour J (2011). Idiopathic granulomatous mastitis associated with *Corynebacterium* sp. infection. *Hawaii Med J* 70: 99–101.
- Stevenson LG, Drake SK, Murray PR (2010). Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 48: 444–447.
- Stewart EJ (2012). Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol* 194: 4151–4160.
- Stivanello E, Rucci P, Lenzi J, Fantini MP

- (2014). Determinants of cesarean delivery: a classification tree analysis. *BMC Pregnancy Childbirth* 14: 215.
- Strong GD (2011). Provider management and support for breastfeeding pain. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 40: 753–764.
- Stuebe A (2009). The risks of not breastfeeding for mothers and infants. *Rev Obstet Gynecol* 2: 222–231.
- Sullivan S, Schanler RJ, Kim JH, *et al* (2010). An exclusively human milk-based diet is associated with a lower rate of necrotizing enterocolitis than a diet of human milk and bovine milk-based products. *J Pediatr* 156: 562–567.
- Sun F, Qu F, Ling Y, *et al* (2013). Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. *Future Microbiol* 8: 877–886.
- Suter VGA, Bornstein MM (2009). Ankyloglossia: facts and myths in diagnosis and treatment. *J Periodontol* 80: 1204–1219.
- Szczuka E, Telega K, Kaznowski A (2015). Biofilm formation by *Staphylococcus hominis* strains isolated from human clinical specimens. *Folia Microbiol (Praha)* 60: 1–5.
- Szewzyk U, Szewzyk R, Manz W, Schleifer KH (2000). Microbiological safety of drinking water. *Annu Rev Microbiol* 54: 81–127.
- Tang L, Lee AH, Qiu L, Binns CW (2014). Mastitis in Chinese breastfeeding mothers: a prospective cohort study. *Breastfeed Med* 9: 35–38.
- Taponen S, Salmikivi L, Simojoki H, Koskinen MT, Pyörälä S (2009). Real-time polymerase chain reaction-based identification of bacteria in milk samples from bovine clinical mastitis with no growth in conventional culturing. *J Dairy Sci* 92: 2610–2617.
- Tauro LF, Martis JS, George C, Kamath A, Lobo G, Hegde BR (2011). Tuberculous mastitis presenting as breast abscess. *Oman Med J* 26: 53–55.
- Taylor GB, Paviour SD, Musaad S, Jones WO, Holland DJ (2003). A clinicopathological review of 34 cases of inflammatory breast disease showing an association between corynebacteria infection and granulomatous mastitis. *Pathology* 35: 109–119.
- Teich AS, Barnett J, Bonuck K (2014). Women's perceptions of breastfeeding barriers in early postpartum period: a qualitative analysis nested in two randomized controlled trials. *Breastfeed Med* 9: 9–15.
- Teles C, Smith A, Ramage G, Lang S (2011). Identification of clinically relevant viridans group streptococci by phenotypic and genotypic analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 243–250.
- Tewari M, Shukla HS (2005). Breast tuberculosis: diagnosis, clinical features & management. *Indian J Med Res* 122: 103–110.
- Thavagnanam S, Fleming J, Bromley A, Shields MD, Cardwell CR (2008). A meta-analysis of the association between Caesarean section and childhood asthma. *Clin Exp Allergy* 38: 629–633.
- Thomsen AC (1982). Infectious mastitis and occurrence of antibody-coated bacteria in milk. *Am J Obstet Gynecol* 144: 350–351.
- Thomsen AC, Hansen KB, Møller BR (1983). Leukocyte counts and microbiologic cultivation in the diagnosis of puerperal mastitis. *Am J Obstet Gynecol* 146: 938–941.
- Thomsen AC, Mogensen SC, Løve Jepsen F (1985). Experimental mastitis in mice induced by coagulase-negative staphylococci isolated from cases of mastitis in nursing women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 64: 163–166.
- Thorberg B-M, Kühn I, Aarestrup FM, Brändström B, Jonsson P, Danielsson-Tham M-L (2006). Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet Microbiol* 115: 163–172.
- Tomazi T, Gonçalves JL, Barreiro JR, *et al* (2014). Identification of coagulase-

- negative staphylococci from bovine intramammary infection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 52: 1658–1663.
- Tortora GJ, Derrickson B (2013). *Principios de Anatomía y Fisiología*. 13ª Edición. Editorial Médica Panamericana.
- Trejo-de la O A, Hernández-Sancén P, Maldonado-Bernal C (2014). Relevance of single-nucleotide polymorphisms in human TLR genes to infectious and inflammatory diseases and cancer. *Genes Immun* 15: 199–209.
- Trikha S, Lee EC, Jeremic AM (2010). Cell secretion: current structural and biochemical insights. *ScientificWorldJournal* 10: 2054–2069.
- Trivedi B (2012). Microbiome: The surface brigade. *Nature* 492: S60–61.
- Trujillano J, Sarria-Santamera A, Esquerda A, Badia M, Palma M, March J (2008). Aproximación a la metodología basada en árboles de decisión (CART): Mortalidad hospitalaria del infarto agudo de miocardio. *Gaceta Sanitaria* 22: 65–72.
- Tuli R, O'Hara BJ, Hines J, Rosenberg AL (2007). Idiopathic granulomatous mastitis masquerading as carcinoma of the breast: a case report and review of the literature. *Int Semin Surg Oncol* 4: 21.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett C, Knight R, Gordon JI (2007). The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature* 449: 804–810.
- Tušar T, Žerdoner K, Bogovič Matijašić B, et al (2014). Cultivable bacteria from milk from Slovenian breastfeeding mothers. *Food Technol Biotechnol* 52: 242–247.
- Ubeda C, Pamer EG (2012). Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends Immunol* 33: 459–466.
- Ulitzs D, Nyman MKG, Carlson RA (2004). Breast abscess in lactating women: US-guided treatment. *Radiology* 232: 904–909.
- Urashima T, Asakuma S, Leo F, Fukuda K, Messer M, Oftedal OT (2012). The predominance of type I oligosaccharides is a feature specific to human breast milk. *Adv Nutr* 3: 473S–482S.
- Urbaniak C, McMillan A, Angelini M, et al (2014). Effect of chemotherapy on the microbiota and metabolome of human milk, a case report. *Microbiome* 2: 24.
- U.S. Department of Health and Human Services (2011). *The Surgeon General's Call to Action to Support Breastfeeding*. U.S. Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General. Washington, DC.
- Valour F, Sénéchal A, Dupieux C, et al (2014). Actinomycosis: etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infect Drug Resist* 7: 183–197.
- van Belkum A (2011). Novel technology to study co-evolution of humans and *Staphylococcus aureus*: consequences for interpreting the biology of colonisation and infection. *Adv Exp Med Biol* 697: 273–288.
- van Belkum A, Melles DC, Nouwen J, et al (2009). Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 9: 32–47.
- van den Oever HL, Versteegh FG, Thewissen EA, van den Anker JN, Mouton JW, Neijens HJ (1998). Ciprofloxacin in preterm neonates: case report and review of the literature. *Eur J Pediatr* 157: 843–845.
- van Egmond M, Damen CA, van Spruiel AB, Vidarsson G, van Garderen E, van de Winkel JGJ (2001). IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol* 22: 205–211.
- van Pelt C, Nouwen J, Lugtenburg E, et al (2003). Strict infection control measures do not prevent clonal spread of coagulase negative staphylococci colonizing central venous catheters in neutropenic hemato-oncologic patients. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38: 153–158.
- Vashi R, Hooley R, Butler R, Geisel J, Philpotts L (2013). Breast imaging of

- the pregnant and lactating patient: physiologic changes and common benign entities. *AJR Am J Roentgenol* 200; 329–336.
- Venancio SI, de Almeida H (2004). Kangaroo-Mother Care: scientific evidence and impact on breastfeeding. [Article in Portuguese]. *J Pediatr (Rio J)* 80: S173–180.
- Verani JR, McGee L, Schrag SJ, Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2010). Prevention of perinatal group B streptococcal disease--Revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 59: 1–36.
- Verroken A, Bauraing C, Deplano A, *et al* (2014). Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital. *Clin Microbiol Infect* 20: 44–50.
- Vieira F, Bachion MM, Mota DDCF, Munari DB (2013). A systematic review of the interventions for nipple trauma in breastfeeding mothers. *J Nurs Scholarsh* 45: 116–125.
- Viejo-Díaz M, Andrés MT, Fierro JF (2004). Effects of human lactoferrin on the cytoplasmic membrane of *Candida albicans* cells related with its candidacidal activity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 42: 181–185.
- Viguier C, Arora S, Gilmartin N, Welbeck K, O’Kennedy R (2009). Mastitis detection: current trends and future perspectives. *Trends Biotechnol* 27: 486–493.
- Villar-Tajadura MA, Rodríguez-Alcalá LM, Martín V, *et al* (2014). Production of conjugated linoleic and conjugated  $\alpha$ -linolenic acid in a reconstituted skim milk-based medium by bifidobacterial strains isolated from human breast milk. *Biomed Res Int* 2014: 725406.
- Vlahou A, Schorge JO, Gregory BW, Coleman RL (2003). Diagnosis of ovarian cancer using decision tree classification of mass spectral data. *J Biomed Biotechnol* 2003: 308–314.
- Vogel A, Hutchison BL, Mitchell EA (1999). Mastitis in the first year postpartum. *Birth* 26: 218–225.
- Vorbach C, Capecchi MR, Penninger JM (2006). Evolution of the mammary gland from the innate immune system? *Bioessays* 28: 606–616.
- von Stumm S, Plomin R (2015). Breastfeeding and IQ growth from toddlerhood through adolescence. *PLoS ONE* 10: e0138676.
- Vos MC, Ott A, Verbrugh HA (2005). Successful search-and-destroy policy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in The Netherlands. *J Clin Microbiol* 43: 2034–2035.
- Wahl A, Baker C, Spagnuolo RA, *et al* (2015). Breast milk of HIV-positive mothers has potent and species-specific in vivo HIV inhibitory activity. *J Virol*.
- Walfisch A, Sermer C, Cressman A, Koren G (2013). Breast milk and cognitive development—the role of confounders: a systematic review. *BMJ Open* 3: e003259.
- Walker WA, Iyengar RS (2015). Breast milk, microbiota, and intestinal immune homeostasis. *Pediatr Res* 77: 220–228.
- Wang J, Roderiquez G, Norcross MA (2012). Control of adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus* through IL-10, PD-L1, and TLR2. *Sci Rep* 2: 606.
- Ward TL, Hosid S, Ioshikhes I, Altosaar I (2013). Human milk metagenome: a functional capacity analysis. *BMC Microbiology* 13: 116.
- Webb AN, Hao W, Hong P (2013). The effect of tongue-tie division on breastfeeding and speech articulation: a systematic review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 77: 635–646.
- Wellington L, Prasad S (2012). PURLs. Should breastfeeding babies be given pacifiers? *J Fam Pract* 61: E1–3.
- Werner G, Fleige C, Fessler AT, *et al* (2012). Improved identification including MALDI-TOF mass spectrometry analysis of group D streptococci from bovine mastitis and

- subsequent molecular characterization of corresponding *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *Vet Microbiol* 160: 162–169.
- Werno AM, Christner M, Anderson TP, Murdoch DR (2012). Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from nonpneumococcal streptococci of the *Streptococcus mitis* Group by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 50: 2863–2867.
- Weyrich LS, Dixit S, Farrer AG, Cooper AJ, Cooper AJ (2015). The skin microbiome: Associations between altered microbial communities and disease. *Australas J Dermatol* [doi: 10.1111/ajd.12253].
- Wheeler TT, Hodgkinson AJ, Prosser CG, Davis SR (2007). Immune components of colostrum and milk—a historical perspective. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 12: 237–247.
- WHO (1985). Appropriate technology for birth. *Lancet* 2: 436–437.
- WHO (1998). *Evidence for the Ten Steps to Successful Breastfeeding*. Division of Child Health and Development. WHO reference No. WHO/CHD/98.9. Geneva, Switzerland.
- WHO (2000). *Mastitis: Causes and Management*. Department of Child and Adolescent Health and Development. WHO reference No. WHO/FCH/CAH/00.13. Geneva, Switzerland.
- WHO (2007). *Integrated Management of Childhood Illness Complementary Course on HIV/AIDS, Module 3: Counselling the HIV Positive Mother*. Division for Child and Adolescent Health [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44006/4/9789241594370.m3\_eng.pdf]. Consultado: 9/9/2015
- WHO (2009). *World Health Statistics 2009*. WHO Statistical Information System (WHOSIS). [http://www.who.int/whosis/whostat/2009/en/]. Consultado: 9/9/2015
- WHO (2014). *Antimicrobial Resistance: Global report on surveillance*. Geneva, Switzerland.
- WHO (2015). *WHO Statement on Caesarean section rates*. Department of Reproductive Health and Research. WHO reference No. WHO/RHR/15.02. Geneva, Switzerland.
- WHO/UNICEF (2003). *Global strategy for infant and young child feeding*. Geneva, Switzerland.
- WHO/UNICEF (2009a). *Acceptable medical reasons for use of breast-milk substitutes*. WHO reference No: WHO/NMH/NHD/09.01, WHO/FCH/CAH/09.01. Department of Nutrition for Health and Development. Department of Child and Adolescent Health and Development. Geneva, Switzerland.
- WHO/UNICEF (2009b). *Baby-Friendly Hospital Initiative: Revised, updated and expanded for integrated care*. Geneva, Switzerland.
- WHO/UNICEF (2014). *Global Nutrition Targets 2025: Breastfeeding policy brief*. WHO reference No: WHO/NMH/NHD/14.7. Department of Nutrition for Health and Development. Geneva, Switzerland.
- Wijnands KPJ, Obermann-Borst SA, Steegers-Theunissen RPM (2015). Early life lipid profile and metabolic programming in very young children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 25: 608–614.
- Wilde CJ, Addey CV, Bryson JM, Finch LM, Knight CH, Peaker M (1998). Autocrine regulation of milk secretion. *Biochem Soc Symp* 63: 81–90.
- Winn WC Jr, Allen S, Janda W, et al (Eds.) (2006). *Koneman's Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology*. 6th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Witt AM, Burgess K, Hawn TR, Zyzanski S (2014a). Role of oral antibiotics in treatment of breastfeeding women with chronic breast pain who fail conservative therapy. *Breastfeed Med* 9: 63–72.
- Witt A, Mason MJ, Burgess K, Flocke S, Zyzanski S (2014b). A case control study of bacterial species and colony count in milk of breastfeeding women with chronic pain. *Breastfeed Med* 9: 29–34.

- Wohl DL, Curry WJ, Mauger D, Miller J, Tyrie K (2015). Intrapartum antibiotics and childhood atopic dermatitis. *J Am Board Fam Med* 28: 82–89.
- Wojtyczka RD, Orlewska K, Kępa M, *et al* (2014). Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* strains from a hospital environment. *Int J Environ Res Public Health* 11: 4619–4633.
- Wolf C, Kusch H, Monecke S, *et al* (2011). Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. *Proteomics* 11: 2491–2502.
- Wolk D, Mitchell S, Patel R (2001). Principles of molecular microbiology testing methods. *Infect Dis Clin North Am* 15: 1157–1204.
- Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen K-Y (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 14: 908–934.
- Wu M, Chason R, Wong M (2012). Raynaud's phenomenon of the nipple. *Obstet Gynecol* 119: 447–449.
- Wu T-C, Chen P-H (2013). Nucleotides and nucleosides in human milk: a perspective from Taiwan. In: *Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk*. Human Health Handbooks. Volume 5. Zibadi S, Watson RR, Preedy VR (Eds). Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, pp. 491–499.
- Xuan C, Shamonki JM, Chung A, *et al* (2014). Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. *PLoS ONE* 9: e83744.
- Xu SX, McCormick JK (2012). Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Front Cell Infect Microbiol* 2: 52.
- Yamane K, Nambu T, Yamanaka T, *et al* (2010). Complete genome sequence of *Rothia mucilaginosa* DY-18: a clinical isolate with dense meshwork-like structures from a persistent apical periodontitis lesion. *Sequencing* 2010: 1–6.
- Yang Y-X, Zhao X-X, Zhang Y (2009). Proteomic analysis of mammary tissues from healthy cows and clinical mastitic cows for identification of disease-related proteins. *Vet Res Commun* 33: 295–303.
- Yao Y, Sturdevant DE, Otto M (2005). Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis* 191: 289–298.
- Yu JH, Kim MJ, Cho H, Liu HJ, Han S-J, Ahn T-G (2013). Breast diseases during pregnancy and lactation. *Obstet Gynecol Sci* 56: 143–159.
- Zadoks RN, Middleton JR, McDougall S, Katholm J, Schukken YH (2011). Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 16: 357–372.
- Zaura E, Nicu EA, Krom BP, Keijser BJB (2014). Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 85.
- Zhou C, Tao L, Hu B, *et al* (2015). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of beta-hemolytic streptococci. *J Thorac Dis* 7: 591–595.
- Ziegler EE (2006). Growth of breast-fed and formula-fed infants. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 58: 51–59; discussion 59–63.
- Zucali M, Bava L, Tamburini A, Brasca M, Vanoni L, Sandrucci A (2011). Effects of season, milking routine and cow cleanliness on bacterial and somatic cell counts of bulk tank milk. *J Dairy Res* 78: 436–441.



## *X. Apéndices*

---

### *Apéndice X.1*

*Diagnóstico etiológico de las mastitis  
infecciosas: propuesta de protocolo para el  
cultivo de muestras de leche humana*

*(Acta Pediátrica Española)*





# Diagnóstico etiológico de las mastitis infecciosas: propuesta de protocolo para el cultivo de muestras de leche humana

R. Arroyo, P. Mediano, V. Martín, E. Jiménez, S. Delgado, L. Fernández, M. Marín, J.M. Rodríguez  
*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid*

## Resumen

En condiciones fisiológicas, la microbiota mamaria de una mujer lactante se caracteriza por la presencia de una población relativamente heterogénea, dominada por ciertas bacterias grampositivas, en una concentración moderada (<1.000 unidades formadoras de colonias/mL de leche). Sin embargo, hay ciertas circunstancias que pueden conducir a una auténtica disbiosis de la microbiota normal de la glándula mamaria y a una mastitis. Se trata de un problema infravalorado, en gran medida por la ausencia de protocolos para la recogida de este fluido biológico, por la falta de tradición en el análisis microbiológico de la leche humana y por las dudas que suelen surgir a la hora de interpretar los resultados. En este artículo se presenta un protocolo básico para la recogida de muestras de leche humana para su análisis microbiológico y se ofrecen unas pautas sencillas para la interpretación de los resultados.

## Palabras clave

Mastitis, leche humana, análisis microbiológico, protocolo, cultivo

## Abstract

**Title:** Etiological diagnosis of infectious mastitis: proposal of a protocol for the culture of human milk samples

During lactation, the physiological mammary microbiotas characterized by the presence of a relatively heterogeneous population, dominated by certain Gram-positive bacteria, at a moderated concentration (<1,000 CFU/mL milk). However, there are circumstances that may lead to a disbiotic process of the mammary gland microbiota, leading to mastitis. This is a widely underrated condition, partly due to the absence of uniform protocols for the collection of this biological fluid, the lack of tradition in microbiological analysis of human milk, and the doubts that sometimes arise when the results interpretation is being done. In this article, we present a basic protocol for the collection of human milk samples for their microbiological analysis and simple guidelines in order to facilitate the interpretation of the results.

## Keywords

Mastitis, human milk, microbiological analysis, protocol, culture

## Introducción

Tradicionalmente, se había considerado que la leche humana era estéril mientras se encontraba dentro de la glándula mamaria. Sin embargo, actualmente sabemos que constituye una fuente de bacterias para el intestino infantil<sup>1-4</sup>, y uno de los factores clave en la iniciación y el desarrollo de la microbiota intestinal del neonato<sup>5-7</sup>. En su mayor parte, estas bacterias no provienen de la contaminación a partir del contacto con la piel, sino que constituyen una auténtica microbiota mamaria, que se empieza a formar durante el último tercio del embarazo y que desaparece tras el destete<sup>8</sup>. En condiciones fisiológicas, los cultivos de leche se caracterizan, cualitativamente, por la presencia de una población relativamente heterogénea, dominada por estafilococos, estreptococos, bifidobacterias, bacterias lácticas y algunas otras bacterias grampositivas; todas ellas parecen desempeñar funciones importantes para la homeostasis mamaria y del lactante. Desde un punto de vista cuantitativo, la concentración bacteriana en leche fresca obtenida de

una mujer sana (y en las condiciones que se comentarán posteriormente) es muy moderada, y habitualmente se sitúa en torno a 100-300 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, aunque en algunos casos se pueden alcanzar valores de hasta aproximadamente 1.000 UFC/mL.

Sin embargo, hay ciertas circunstancias que pueden conducir a una auténtica disbiosis de la microbiota normal de la glándula mamaria, con un aumento notable y rápido de la concentración de los agentes causales de mastitis (habitualmente estafilococos y estreptococos) y la progresiva desaparición del resto de las bacterias «fisiológicas» de la leche (lactobacilos, lactococos, enterococos, bifidobacterias...) mediante procesos de exclusión competitiva<sup>9</sup>. Esta alteración conduce a la inflamación y la posterior obstrucción de los conductos galactóforos, dando lugar a una mastitis<sup>10,11</sup>. Algunas mastitis pueden cursar de forma aguda y con una sintomatología florida, tanto local como general (fiebre, escalofríos, infartación de ganglios, malestar general, cefaleas...), e incluso derivar en un absce-

so<sup>12</sup>; el agente etiológico de tales casos es, casi invariablemente, *Staphylococcus aureus*<sup>13</sup>. Sin embargo, en la mayoría de las mastitis, los síntomas se restringen a la glándula mamaria y se caracterizan por un dolor intenso en forma de pinchazos, calambres o sensación de quemazón, acompañado o no de lesiones en el pezón. En algunas ocasiones, la mastitis puede incluso ser subclínica y caracterizarse por una falsa sensación de disminución en la producción de leche (cuando en realidad está afectada la secreción debido a la obstrucción de conductos). En estos casos, los agentes responsables suelen ser estafilococos coagulasa-negativos (fundamentalmente *Staphylococcus epidermidis*)<sup>14</sup> y algunas especies de estreptococos, como *Streptococcus mitis* o *Streptococcus salivarius*.

## Necesidad de los cultivos de leche humana para el diagnóstico de mastitis

La mastitis humana constituye un problema tan infravalorado como infradiagnosticado<sup>10,11</sup>. Este hecho se debe, por una parte, a que únicamente se suelen considerar como tales los casos agudos que cursan con enrojecimiento del pecho y fiebre elevada y, por otra parte, a que los casos en que se realiza un cultivo de leche son verdaderamente excepcionales y, cuando se hacen, la recogida de la muestra y/o la interpretación de los resultados suele ser errónea. En tales circunstancias, el diagnóstico de «mastitis» se suele basar en la inspección visual del pecho, lo que no sólo excluye a la mayoría de los casos, sino que fomenta falsas creencias, como el mito de las candidas (la popular frase «tiene hongos»)<sup>10,15</sup>. Por tanto, la posibilidad de un error en el diagnóstico es muy elevada.

Pero el cultivo de leche no sólo es esencial para el diagnóstico etiológico de una mastitis, sino que suele ser clave para el éxito del abordaje terapéutico. Habitualmente, el tratamiento de la mastitis se instaura de forma empírica y suele consistir en la prescripción de cloxacilina, amoxicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, mupirocina o eritromicina. Desafortunadamente, un porcentaje cada vez más elevado de cepas implicadas en la mastitis son resistentes a estos antibióticos, una situación que se ha descrito previamente para las cepas asociadas con la mastitis bovina. Por este motivo, una parte de las mastitis tratadas con antibióticos derivan en una infección crónica o recurrente. Además, en los cultivos de leche es frecuente aislar dos o más especies implicadas en un mismo caso de mastitis y, si todas ellas no son sensibles al antibiótico elegido, se puede eliminar uno de los agentes causales pero fomentar el crecimiento de la bacteria resistente. En conclusión, el tratamiento de las mastitis infecciosas debería instaurarse tras un análisis microbiológico que determine el agente causal y su sensibilidad a los antibióticos.

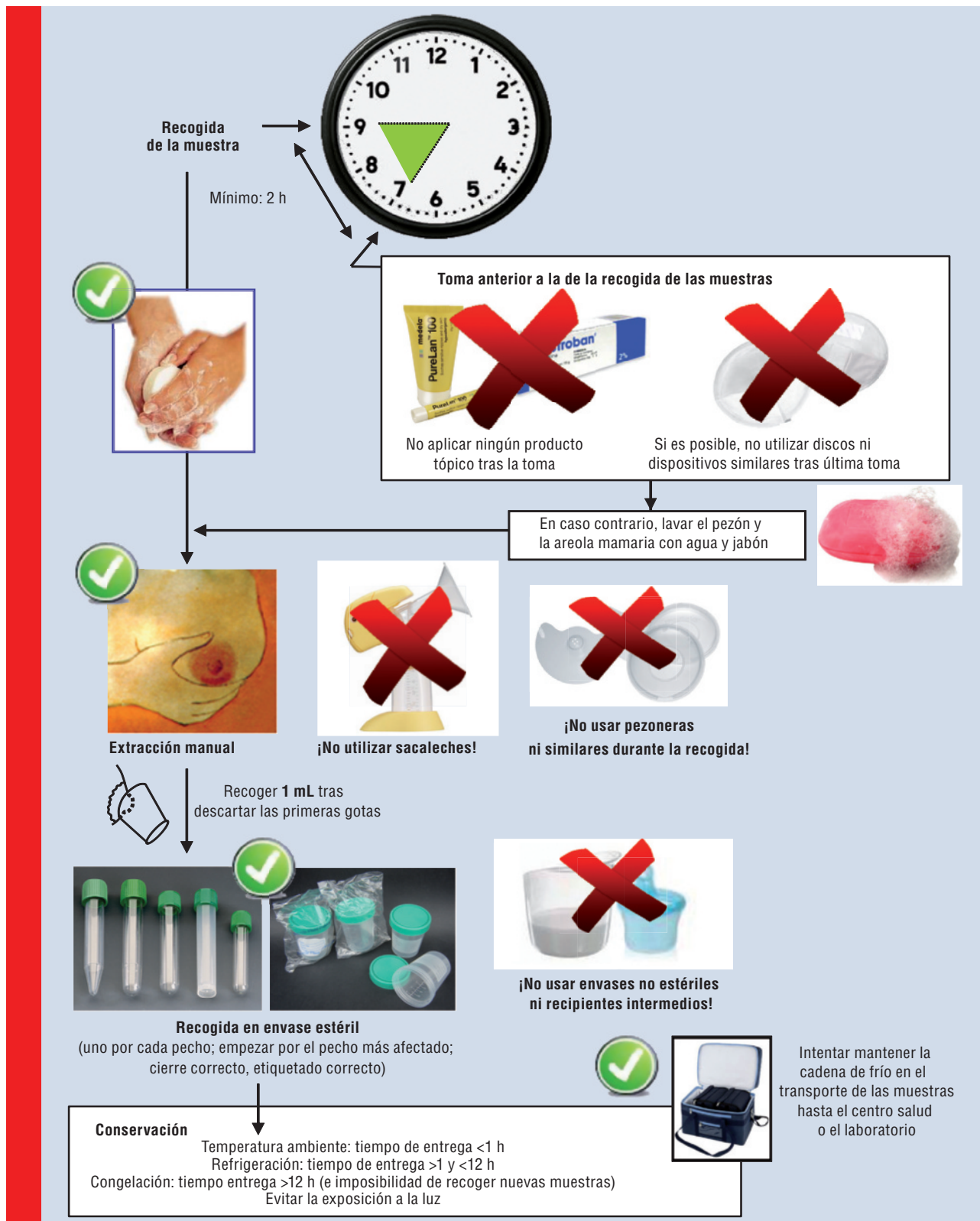
Ante la ausencia de un diagnóstico etiológico y la frecuente prescripción de un tratamiento inadecuado, las mujeres con este problema suelen enfrentarse a un difícil dilema: a) seguir amamantando a su hijo aguantando el dolor y el resto de síntomas lo mejor posible y, en muchos casos, ante la incompre-

sión de su propio entorno médico y/o familiar, o b) abandonar la lactancia. Sin embargo, un número creciente de mujeres lactantes que se encuentran ante este problema exigen una tercera vía: un correcto diagnóstico y un tratamiento acorde con su caso particular. En este contexto, la implantación sistemática de los cultivos de leche en los servicios de microbiología de los hospitales puede ofrecer una solución para un buen porcentaje de casos. Este hecho no es caprichoso ni banal, ya que la lactancia materna está siendo objeto de un renovado interés en los países desarrollados debido a los beneficios que este tipo de alimentación proporciona a la pareja madre-hijo a corto, medio y largo plazo<sup>16,17</sup>.

## Obtención y conservación de las muestras

Las instrucciones para la recogida de la muestra son responsabilidad directa del médico que solicita el cultivo, quien debe proporcionarlas (él o el personal sanitario encargado de la paciente) de forma clara y sencilla, cerciorándose de su adecuada comprensión. En general, las muestras de leche se deben recoger siguiendo las siguientes instrucciones (figura 1):

1. Las muestras se deben recoger inmediatamente antes de una toma y, si es posible, tras haber transcurrido al menos 2 horas desde la toma anterior. Si se van a procesar en el servicio de microbiología de un hospital público, el mejor momento para su recogida sería tras la primera toma de la mañana (6.00-9.00 h); de este modo, la recogida se sincronizaría con el periodo habitual para otro tipo de muestras biológicas (orina, sangre...) en los centros de atención primaria; por otra parte, se evitarían posibles fluctuaciones relacionadas con el ritmo circadiano.
2. Tras la toma anterior a aquella en la que se vayan a recoger las muestras para el cultivo, no se debe aplicar ningún tipo de pomada o solución tópica (lanolina, antibióticos, antisépticos, antiinflamatorios, productos de homeopatía...) ni tampoco utilizar ningún tipo de accesorio (conchas...) que provoque una acumulación de leche en contacto directo con las areolas mamarias y los pezones; en caso contrario, se deben lavar dichas partes del pecho con agua templada y jabón neutro, y secarlos con una toalla limpia o una toallita de un solo uso inmediatamente antes de la recogida.
3. Inmediatamente antes de la recogida, la paciente debe lavarse las manos con agua caliente y jabón (o un producto similar) y secárselas con una toalla limpia o una toallita de un solo uso.
4. Tras la estimulación previa del pecho, la recogida de muestras de leche destinadas a un análisis microbiológico se debe efectuar mediante presión manual, sin la ayuda de ningún tipo de accesorio (pezoneras, formadores de pezones...). En ningún caso se deben emplear extractores (sacaleches). Todos estos utensilios pueden ser una fuente importante de microorganismos ajenos a la glándula mamaria, que persisten tras la aplicación de los protocolos de limpieza y/o desinfección recomendados por los fabricantes<sup>18-20</sup>. Por tanto, su



**Figura 1.** Esquema de los principales pasos a seguir para la recogida de muestras de leche destinadas a un análisis microbiológico

presencia puede enmascarar los verdaderos agentes responsables de una mastitis. En general, los microorganismos contaminantes suelen ser enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y afines (*Stenotrophomonas* spp., etc.) y levaduras, que acostumbra a estar ausentes o presentes en concentraciones muy bajas en la leche humana. Muchos de ellos son psicrótrofos, por lo que siguen proliferando durante la conservación de la leche en frío. Por otra parte, conviene recordar que el agua potable con la que se lavan o aclaran las bombas y otros accesorios suele contener cantidades relativamente elevadas de algunos de estos microorganismos.

En un caso reciente, que puede resultar ilustrativo, a una mujer se le diagnosticó una mastitis por *Stenotrophomonas maltophilia*, ya que en el laboratorio de microbiología del hospital de referencia se encontró una gran concentración de una cepa de este género en la muestra analizada. Como la cepa era sensible a la amoxicilina, se prescribió este tratamiento. Ante la ineficacia del tratamiento, se remitieron muestras extraídas manualmente a nuestro laboratorio, donde se observó que realmente el agente causal era una cepa de *S. epidermidis* resistente a ese antibiótico. Esta cepa también había sido detectada en el hospital, pero se desestimó como agente causal por ser «saprofita o posible contaminante». Es decir, justo los papeles cambiados. La cepa de *S. maltophilia* se aisló del equipo de bombeo y del agua del grifo empleado para su lavado, pero no de la leche obtenida por expresión manual.

5. Las muestras de leche se deben recoger en envases estériles, como los empleados habitualmente para el análisis de muestras de orina o heces. Hay que recoger una muestra de cada pecho (cada una en un envase independiente), empezando por el pecho que esté menos afectado en el momento de la recogida, descartando las primeras gotas de leche (aunque este hecho parece no afectar significativamente al resultado del análisis microbiológico). Si los dos pechos tienen aproximadamente el mismo nivel de afectación, el orden es indiferente. El recipiente se debe colocar debajo del pezón, dentro de la areola mamaria.
6. Evitar tocar el interior del frasco o del tapón con los dedos, así como el contacto con cuerpos extraños.
7. No utilizar nunca recipientes intermediarios (cucharas, biberones, vasos, botellas, etc.) para recoger la leche antes de transferirla al envase estéril.
8. El volumen necesario para el cultivo de una muestra de leche es de 1 mL. Habitualmente, se siembra la muestra sin diluir y las diluciones -1 y -2 (5-50 µL por medio de cultivo).
9. Cerrar perfectamente el frasco para evitar derramamientos durante su transporte.
10. Rellenar una etiqueta con el nombre, apellidos, pecho del que procede la muestra y fecha y hora de la recogida. Pegar la etiqueta sobre el frasco seco. Obviamente, esto no será necesario cuando el análisis se realice en un centro de salud mediante el volante correspondiente ya que, en tal caso, llevará un código identificativo.
11. Las muestras pueden permanecer sin refrigerar un máximo de 1 hora. Si el tiempo de entrega va a ser superior a 1 hora,

se pueden mantener en refrigeración a 4° C durante un máximo de 12 horas. Si el tiempo de entrega de las muestras va a ser superior a 12 horas, y no hay posibilidad de obtener nuevas muestras, es preferible conservarlas congeladas a una temperatura igual o inferior a -20 °C, sin que se rompa la cadena de frío.

## Recepción de las muestras

Durante la recepción de una muestra de leche hay que comprobar los siguientes aspectos:

1. Las muestras han sido remitidas en recipientes estériles. En caso contrario no se admitirán, explicando a la paciente la necesidad de una esterilidad absoluta del recipiente de recogida para garantizar la calidad de los resultados emitidos.
2. El tapón de rosca está perfectamente cerrado y no se ha derramado la muestra. En caso contrario no se admitirá la muestra, explicando a la paciente la necesidad de una estanqueidad absoluta del recipiente para evitar la contaminación de la muestra y así garantizar la calidad de los resultados emitidos.
3. El frasco porta una etiqueta con un código adecuado o con el nombre y los apellidos de la paciente, pecho (derecho o izquierdo) y fecha y hora de recogida. En caso contrario se solicitarán los datos necesarios.

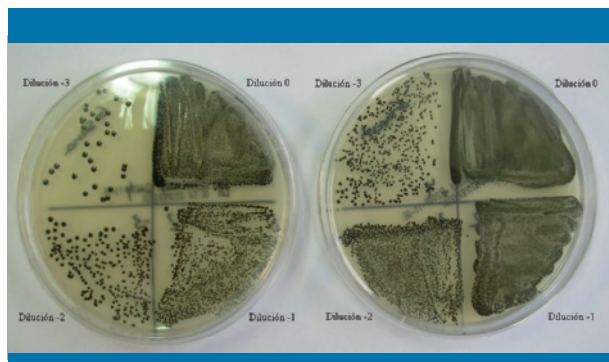
Siempre que la muestra no se haya remitido en condiciones apropiadas, se proporcionará a la paciente una hoja de instrucciones de recogida de muestras de leche para un análisis microbiológico.

## Siembra de las muestras

Los medios de cultivo que se emplean habitualmente en nuestro laboratorio son el agar Columbia con ácido nalidíxico (CNA; aislamiento de estafilococos, estreptococos, enterococos, corinebacterias...), el agar Baird Parker (BP; aislamiento de estafilococos), el agar MacConkey (MCK; aislamiento de enterobacterias) y el agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol (SDC; aislamiento de levaduras). Entre todos ellos, el único medio imprescindible es el CNA (o, en su defecto, algún otro tipo de agar sangre), ya que permite el crecimiento simultáneo de la mayoría de las especies causantes de mastitis. En nuestro caso, los medios MCK y SDC se emplean fundamentalmente para comprobar que no ha habido contaminación de las muestras.

En principio, cualquier técnica de siembra de muestras biológicas es aplicable a las muestras de leche: desde la técnica de siembra con asa calibrada de 5 µL en forma de estría longitudinal, seguida de agotamiento total de la placa (muy extendida en los servicios de microbiología de los hospitales), hasta los sistemas semiautomáticos de siembra en espiral. Cualquiera de ellas permite la cuantificación de los microorganismos presentes en la muestra (figura 2).





**Figura 2.** Placas de medio Baird Parker tras la siembra y la incubación de muestras de leche humana. Izquierda: mastitis por *Staphylococcus aureus*; derecha: mastitis por *Staphylococcus epidermidis*

Las placas sembradas se deben incubar a 35-37 °C en atmósfera aerobia, con placa invertida. La lectura se debe realizar a las 24-48 horas. Los resultados recogerán la concentración de cada especie presente en la muestra, expresada en UFC/mL. El hecho de no observar colonias en las placas no significa que no haya bacterias en la muestra, sino que éstas pueden estar presentes en una concentración inferior a la de su límite de detección. En tal caso, el resultado será «no se detecta crecimiento bacteriano» o «inferior al valor del límite de detección» (p. ej., 100 UFC/mL).

La identificación de las especies implicadas no debería plantear ningún problema para un laboratorio de microbiología clínica. Para ello, se pueden utilizar diversas técnicas (clásicas, Wíder, Vitek, MALDI-TOF...). Posiblemente, el mayor reto estriben en una correcta identificación de algunas de las especies de estreptococos del grupo *viridans*, ya que son difíciles de diferenciar tanto en los medios de cultivo como con algunos de los procedimientos de identificación habituales. No obstante, en caso de duda, se puede conseguir mediante secuenciación de ciertos genes (evitando el que codifica la fracción 16S del ARNr, ya que su poder discriminatorio es muy bajo para los estreptococos), reacción en cadena de la polimerasa específica de especie y/o algunas pruebas fenotípicas (optoquina, solubilidad en bilis...).

## Interpretación de los resultados

La mayor o menor severidad de la sintomatología asociada a una mastitis está estrechamente relacionada con la especie o las especies bacterianas implicadas, su concentración, las características de la cepa y el estado del hospedador.

En cualquier caso, cuando se analizan muestras de leche resulta fundamental no considerar la presencia de estafilococos coagulasa-negativos (especialmente *S. epidermidis*) y estreptococos del grupo *viridans* (especialmente *S. mitis* y *S. salivarius*) como «flora contaminante» o «flora saprofita», sino como agentes potencialmente causantes de mastitis. Desafortunadamente, esa apreciación suele ser habitual y conduce a un diagnóstico

erróneo. En este sentido, la presencia de estas especies en leche siempre debe considerarse relevante, como sucede con *S. epidermidis* en muestras de infecciones hospitalarias asociadas a catéteres. Por consiguiente, se debe proceder a determinar su antibiograma. En condiciones fisiológicas, la concentración de estafilococos coagulasa-negativos, estreptococos del grupo *viridans* y bacterias afines (*Rothia* spp., *Kocuria* spp., etc.) en muestras de leche recogida en las condiciones descritas anteriormente suele oscilar entre 100 y 300 UFC/mL, con un límite máximo de, aproximadamente, 1.000 UFC/mL. Cualquier valor por encima de esta concentración puede ser compatible con una mastitis infecciosa. No obstante, el valor suele estar notablemente aumentado (>5.000 UFC/mL).

*S. aureus* y *Corynebacterium* spp. no suelen estar presentes en la leche humana en condiciones fisiológicas y pueden provocar mastitis en concentraciones mucho más bajas que las especies antes citadas (<500 UFC/mL).

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de bacterias gramnegativas (*E. coli*, otros coliformes, *Stenotrophomonas*...) y levaduras suele estar asociada a un protocolo inadecuado de recogida de las muestras. En tales casos, pueden estar presentes en concentraciones elevadas para este tipo de muestras (>1.000 UFC/mL).

## Bibliografía

1. Beasley SS, Saris, PEJ. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. Appl Environ Microbiol. 2004; 70: 5.051-5.053.
2. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. J Pediatr. 2003; 143: 754-758.
3. Martín R, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. J Hum Lact. 2005; 21: 8-17.
4. Rodríguez JM, Jiménez E, Merino V, Maldonado ML, Marín ML, Fernández L, et al. Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. Acta Pediatr Esp. 2008; 66: 77-82.
5. Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, Rodríguez JM. Diversity of the Lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. J Appl Microbiol. 2007; 103: 2.638-2.644.
6. Jiménez E, Delgado S, Maldonado A, Arroyo R, Albújar M, García N, et al. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. BMC Microbiol. 2008.
7. Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín M, Zoetendal EG, et al. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. Appl Environ Microbiol. 2009; 75: 965-969.
8. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Olivares M, et al. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends Food Sci Technol. 2004; 15: 121-127.
9. Delgado S, Arroyo R, Martín R, Rodríguez JM. PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. BMC Infect Dis. 2008; 8: 51.

10. Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (I). Acta Pediatr Esp. 2009; 67: 77-84.
11. Jiménez E, Delgado S, Arroyo R, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (II). Acta Pediatr Esp. 2009; 67: 125-132.
12. Amir LH, Forster D, McLachlan H, Lumley J. Incidence of breast abscess in lactating women: report from an Australian cohort. BJOG. 2004; 111: 1.378-1.381.
13. Stafford I, Hernández J, Laibl V, Sheffield J, Roberts S, Wendel G. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients with puerperal mastitis requiring hospitalization. Obstet Gynecol. 2008; 112: 533-537.
14. Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Herrero E, Del Campo R, Marín M, et al. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. BMC Microbiol. 2009; 9: 82.
15. Carmichael AR, Dixon JM. Is lactation mastitis and shooting breast pain experienced by women during lactation caused by *Candida albicans*? Breast. 2002; 11: 88-90.
16. Schack-Nielsen L, Larnkjaer A, Michaelsen KF. Long term effects of breastfeeding on the infant and mother. Adv Exp Med Biol. 2005; 569: 16-23.
17. Schack-Nielsen L, Michaelsen KF. Breast feeding and future health. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2006; 9: 289-296.
18. Boo NY, Nordin AJ, Alfizah H, Nor-Rohaini AH, Lim VKE. Contamination of breast milk obtained by manual expression and breast pumps in mothers of very low birthweight infants. J Hosp Infect. 2001; 49: 274-281.
19. Brown SL, Bright RS, Dwyer DE, Foxman B. Breast pump adverse events: reports to the Food and Drug Administration. J Hum Lact. 2005; 21: 169-174.
20. Marín ML, Arroyo R, Jiménez E, Gómez A, Fernández L, Rodríguez JM. Frozen storage of human milk: effect on its bacterial composition. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2008; 49: 343-348.

## *X. Apéndices*

---

### *Apéndice X.2*

*Lactancia materna y mastitis. Tratamiento  
empírico basado en la sintomatología y los  
agentes etiológicos*

*(Acta Pediátrica Española)*





# Lactancia materna y mastitis. Tratamiento empírico basado en la sintomatología y los agentes etiológicos

M. Carrera<sup>1</sup>, R. Arroyo<sup>2</sup>, P. Mediano<sup>2</sup>, L. Fernández<sup>2</sup>, M. Marín<sup>2</sup>, J.M. Rodríguez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Atención Primaria Silvano. <sup>2</sup>Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid

## Resumen

Las mastitis representan la principal causa médica de destete precoz. Generalmente, las mastitis agudas se diagnostican sin dificultad, pero no así las mastitis subagudas o las subclínicas. Para el tratamiento de los diferentes tipos de mastitis sería deseable disponer de los resultados de un cultivo y de un antibiograma. Sin embargo, actualmente son muy escasos los servicios de microbiología que realizan análisis microbiológicos de este tipo de muestras. En este contexto, el objetivo de este artículo era relacionar cada tipo de mastitis con los agentes etiológicos, la sintomatología característica y el tratamiento empírico más adecuado. La propuesta de tratamiento está fundamentalmente dirigida a los casos en que no sea posible la realización de cultivos y antibiogramas y/o en los que no se pueda esperar a los resultados para iniciar el tratamiento.

©2012 Ediciones Mayo, S.A. Todos los derechos reservados.

## Palabras clave

Mastitis, tratamiento, probióticos, antibióticos, antiinflamatorios no esteroides (AINE)

## Mastitis agudas, subagudas y subclínicas

En general, las mastitis son el resultado de una alteración de la microbiota fisiológica de la glándula mamaria<sup>1-3</sup>. Se trata de un problema infravalorado por la ausencia de protocolos para la recogida de este fluido, la falta de tradición en el análisis microbiológico de leche humana y las dudas que suelen surgir a la hora de interpretar los resultados<sup>4</sup>. En los últimos meses, los servicios de microbiología de algunos hospitales españoles han empezado a realizar cultivos de leche teniendo en cuenta las instrucciones de recogida de las muestras y de interpretación de los resultados descritas en un artículo anterior<sup>4</sup>. No obstante, la mayor parte de los centros de atención primaria no tienen acceso al análisis de este tipo de muestras. En este sentido, el objetivo de este artículo es presentar, de forma sencilla y concisa, una propuesta de actuación para el tratamiento empírico de las mastitis infecciosas en los casos en que no sea posible la reali-

## Abstract

**Title:** Breastfeeding and mastitis. Empirical treatment based on symptoms and etiological agents

Mastitis represents the main medical reason for precocious weaning. Generally, acute mastitis is easily diagnosed, in contrast to the subacute or subclinical ones. Milk cultures and antibiograms would facilitate a rational treatment of the different types of mastitis; however, the services of Microbiology that routinely perform microbiological analyses of human milk are very scarce at present. In this context, the objective of this article is to associate each type of mastitis with its etiological agents, its characteristic symptoms and the most adequate therapeutic approach. This therapeutic proposal is basically directed to those cases in which milk cultures and antibiograms are not possible and/or those in which is not possible to wait for the results in order to initiate the treatment.

©2012 Ediciones Mayo, S.A. All rights reserved.

## Keywords

Mastitis, treatment, probiotics, antibiotics, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS)

zación de cultivos y antibiogramas y/o en los que no se pueda esperar a los resultados para iniciar el tratamiento. La propuesta, resumida en la tabla 1, se basa en el estudio directo de numerosos casos de mastitis pero, obviamente, está abierta a la incorporación de la experiencia de los profesionales en este ámbito y de los nuevos conocimientos que se vayan adquiriendo.

## Mastitis agudas

Las mastitis agudas se deben, en la inmensa mayoría de los casos, a la presencia de *Staphylococcus aureus* (figura 1). Esta especie de bacterias tiene capacidad para llegar a la glándula mamaria desde el intestino materno y, una vez allí, puede sintetizar toxinas que provocan una gran alteración del tejido mamario, dando lugar a los aparatosos síntomas locales. Teniendo en cuenta la gran vascularización de la glándula mamaria durante la lactancia, una parte importante de las toxinas se absorbe, pasa a la circulación sistémica y provoca un cuadro muy semejante al de la gripe. En un pequeño porcentaje de casos, el tejido

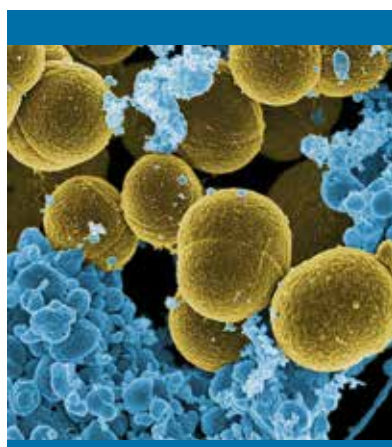
TABLA 1

## Tipos de mastitis, agentes etiológicos, sintomatología característica y tratamiento empírico propuesto

Tipo	Principales agentes etiológicos	Sintomatología <sup>1</sup>	Tratamiento <sup>2</sup>
Agudas <sup>3</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enrojecimiento, aumento de tamaño del pecho</li> <li>• Zonas de induración</li> <li>• Disminución de la secreción de leche</li> <li>• Síntomas similares a la gripe (fiebre, dolores musculares, dolores articulares, escalofríos...)</li> <li>• Abscesos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antibiótico:               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Amoxicilina/ácido clavulánico (1.000/62,5 mg, cada 8-12 h durante 7-10 días)</li> <li>– Cloxacilina</li> <li>– Cefalosporinas</li> </ul> </li> <li>• Antiinflamatorios:               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Alternar paracetamol e ibuprofeno, 600 mg 2-4 veces/día</li> </ul> </li> </ul>
Subagudas <sup>4</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus epidermidis</i></li> <li>• <i>Streptococcus mitis</i></li> <li>• <i>Streptococcus salivarius</i></li> <li>• <i>Rothia</i> spp.</li> <li>• <i>Corynebacterium</i> spp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dolor en el pecho (pinchazos, calambres, sensación de quemazón)</li> <li>• Zonas de induración en el interior del pecho</li> <li>• Disminución en la secreción de leche</li> <li>• La leche sale por 1-2 orificios y escurre/gotea</li> <li>• Niños: tomas largas y/o frecuentes</li> <li>• Alternan momentos en los que están relajados con fases en las que hacen un amamantamiento agresivo (tiran del pezón, movimientos característicos de cabeza)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Probióticos (<math>1 \times 10^9</math> ufc, 3 veces al día):               <ul style="list-style-type: none"> <li>– <i>Lactobacillus salivarius</i></li> <li>– <i>Lactobacillus fermentum</i></li> <li>– <i>Lactobacillus reuteri</i></li> </ul> </li> <li>• Otras especies de <i>Lactobacillus</i> (de venta en farmacias)</li> <li>• Antibióticos (en caso de ser ineficaz el tratamiento con probióticos):               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Ciprofloxacino (750 mg, cada 12 h durante 7-10 días)</li> <li>– Cotrimoxazol</li> </ul> </li> <li>• Antiinflamatorios: ibuprofeno 600 mg, 2-4 veces/día</li> </ul>
Subclínicas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus epidermidis</i></li> <li>• <i>Streptococcus mitis</i></li> <li>• <i>Streptococcus salivarius</i></li> <li>• <i>Rothia</i> spp.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausencia de dolor</li> <li>• Resto similar al de las subagudas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Probióticos (<math>1 \times 10^9</math> ufc, 3 veces al día):               <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus salivarius</i></li> <li>• <i>Lactobacillus fermentum</i></li> <li>• <i>Lactobacillus reuteri</i></li> </ul> </li> <li>• Otras especies de <i>Lactobacillus</i> (de venta en farmacias)</li> </ul>

<sup>1</sup>Todos los tipos de mastitis pueden cursar con presencia o ausencia de grietas. <sup>2</sup>Siempre es conveniente realizar un cultivo y un antibiograma, por si las cepas causantes de la mastitis fuesen resistentes a los antibióticos propuestos. <sup>3</sup>El tratamiento de las mastitis agudas con antibióticos puede conducir a una mastitis subaguda.

<sup>4</sup>Las mastitis subagudas pueden evolucionar a mastitis crónicas o recurrentes.



**Figura 1.** *Staphylococcus aureus*, el principal agente de las mastitis agudas

mamario reacciona tratando de aislar a las bacterias causantes de la mastitis, lo que provoca la formación de abscesos<sup>5</sup>.

### Mastitis subagudas

Las mastitis subagudas están causadas generalmente por estafilococos coagulasa-negativos (*S. epidermidis*<sup>6</sup>; figura 2), estreptococos de los grupos *viridans/mitis* (como *S. mitis* o *S. salivarius*) y algunas especies del género *Corynebacterium*<sup>7,8</sup>. El análisis del genoma de algunas cepas de *S. aureus* y *S. epidermidis* de origen humano concuerda con su implicación en los distintos cuadros de mastitis<sup>9</sup>. Así, mientras la primera especie

está especialmente capacitada para causar infecciones agudas, las propiedades de la segunda están más vinculadas con infecciones crónicas y/o recurrentes.

En estos casos, el cuadro se caracteriza por la presencia de dolor local, más o menos intenso, en forma de «pinchazos» («agujas», «cristales»), calambres o sensación de quemazón, pero sin enrojecimiento de la zona (o muy leve) y sin afectación sistémica. Este hecho confunde frecuentemente el diagnóstico y provoca la infravaloración e infradiagnóstico de la afección<sup>2,3</sup>. En ocasiones, *S. epidermidis* y otros estafilococos coagulasa-negativos también pueden causar abscesos<sup>5</sup>.

Tanto las mastitis agudas como las subagudas suelen ir acompañadas de zonas de induración dentro del pecho y, en ocasiones, de grietas<sup>2,3</sup>. Aunque las grietas se han asociado generalmente a la postura durante la toma o a la anquiloglosia (aspectos que se deben revisar ante dicho problema), no hay que descartar la implicación de las propias bacterias causantes de las mastitis en su etiopatogenia; en este sentido, todas las especies citadas anteriormente son epidermiolíticas *per se* cuando se encuentran en concentraciones elevadas en las glándulas de Montgomery. No obstante, el tratamiento de las grietas queda fuera de los objetivos de este artículo.

### Mastitis subclínicas

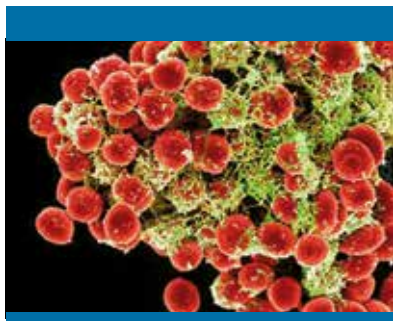
Se trata de cuadros causados generalmente por las mismas especies que las subagudas, pero que no han alcanzado concentra-

TABLA 2

## Nivel de riesgo y parámetros cinéticos de diversos medicamentos empleados en el tratamiento de las mastitis

Medicamento	Nivel de riesgo <sup>1</sup>	Peso molecular (daltons) <sup>2</sup>	T <sub>máx</sub> (h) <sup>3</sup>	Unión a proteínas <sup>4</sup>	T <sub>1/2</sub> (h) <sup>5</sup>	Índice leche/plasma <sup>6</sup>	Biodisponibilidad oral (%) <sup>7</sup>	Dosis terapéutica (mg/kg/día)	Dosis relativa (%) <sup>8</sup>
Amoxicilina	0	365	1,5	18	1,7	0,04	89	0,1	0,4
Amoxicilina + ácido clavulánico	0	365	1,5	18	1,7	0,04	89	0,1	0,4
Cloxacilina	0	436	2	90	3	—	60	0,06	0,36
Ciprofloxacino	0	331	2,3	40	4	2	85	0,6	7,2
Cotrimoxazol	1	—	4	—	10	—	100	—	—
Paracetamol	0	151	2	10	3	1,9	85	0,9	1-4
Ibuprofeno	0	206	3	90	2,5	0,01	80	0,075	0,2

Fuente: e-lactancia (Servicio de Pediatría, Hospital de Denia; <http://www.e-lactancia.org>). <sup>1</sup>Niveles de riesgo: a) nivel 0: sustancia con seguridad demostrada para el lactante. Producto seguro, compatible con la lactancia; b) nivel 1: sustancia que podría provocar efectos adversos muy leves sobre el lactante o de la que no hay datos publicados pero sus características fisicoquímicas y farmacocinéticas de absorción, distribución y eliminación del producto hacen muy poco probable la aparición de efectos adversos. Producto moderadamente seguro. <sup>2</sup>A mayor peso molecular (>500 Da), mayor dificultad de paso a la leche. <sup>3</sup>Tiempo necesario (h) para alcanzar la concentración máxima desde la administración. Es justo el momento en que hay que evitar dar el pecho (mejor tomar el medicamento en cuestión inmediatamente después de dar el pecho). <sup>4</sup>Porcentaje de fijación de la sustancia a las proteínas plasmáticas (baja, <50%; media, 50-80%; alta, >80%). A mayor fijación (sobre todo por encima del 80%), más dificultad de paso a la leche. <sup>5</sup>Semivida de eliminación. Es el tiempo que tarda la concentración plasmática de una sustancia en reducirse a la mitad. Cuanto más corto es (pocas horas), más pronto se elimina y, por tanto, más seguro para la lactancia. <sup>6</sup>Relación de concentración de una sustancia en la leche respecto a su concentración en el plasma. Cuanto menor es esta relación (<1), menos concentración alcanza el medicamento en la leche materna. <sup>7</sup>Porcentaje de sustancia que alcanza la circulación sistémica tras la administración oral. Aunque no se dispone de datos para lactantes, éstos se pueden extrapolar. Cuanto menor sea el porcentaje de biodisponibilidad oral, menos posibilidad de que la sustancia que ha pasado a la leche sea absorbida por el lactante. <sup>8</sup>Porcentaje de dosis materna de un medicamento que llega al lactante. Se consideran seguras cifras inferiores al 10%.



**Figura 2.** *Staphylococcus epidermidis*, uno de los principales agentes de las mastitis subagudas y subclínicas

ciones que lleguen a provocar dolor. Se caracterizan por una falsa sensación de poca producción de leche (que, en general, también sucede en los otros tipos de mastitis) y suelen corresponderse con comentarios habituales del tipo «mi leche no alimenta al niño», «no tengo suficiente leche», «mi leche no es nutritiva»... En la gran mayoría de los casos, ni la producción de leche está comprometida ni la composición nutricional es inadecuada, sino que la formación de biopelículas en el interior de los conductos galactóforos impide su correcta secreción<sup>2,3</sup>.

## Tratamiento empírico de las mastitis agudas

Ante un cuadro agudo, parece lógico y razonable iniciar un tratamiento antibiótico (tabla 1). Actualmente, se suele prescribir un betalactámico (cloxacilina o amoxicilina con/sin ácido clavulánico). En general, la opción más recomendable, en ausen-

cia de cultivo, sería la combinación de amoxicilina y ácido clavulánico (1.000/62,5 mg) en comprimidos de liberación prolongada (tabla 2). La cloxacilina ha sido durante muchos años el antibiótico de elección para estos casos, pero actualmente su eficacia es bastante limitada frente a las cepas de *S. aureus* causantes de mastitis. Conviene tener en cuenta que más del 50% de las cepas de *S. aureus* causantes de abscesos son resistentes a la meticilina<sup>5</sup>. Muchas veces el clínico opta por concentraciones bajas del principio activo en mujeres lactantes; sin embargo, suele ser mejor optar por una concentración elevada que actúe rápidamente y que minimice la generación de cepas resistentes. Conviene tener en cuenta que la concentración de residuos de antibióticos en la leche no es directamente proporcional a la concentración administrada. En este sentido, la información proporcionada por las bases de datos más fiables sobre medicamentos y lactancia (LactMed, United States National Library of Medicine, e-lactancia, Servicio de Pediatría del Hospital de Denia) puede resultar muy útil para el facultativo.

El tratamiento con betalactámicos puede conducir a tres situaciones: a) que el tratamiento sea eficaz y que el problema se solucione por completo, aunque, desafortunadamente, no es la situación más frecuente; b) que las cepas de *S. aureus* implicadas sean resistentes, de tal manera que el cuadro no sólo no mejora, sino que se mantiene e incluso puede empeorar al crearse un ambiente propicio para el crecimiento selectivo de dichas cepas, y c) que sea eficaz frente a *S. aureus* pero que seleccione el crecimiento de estafilococos coagulasa-negativos o estreptococos. Este último caso suele ser bastante común, de tal manera que la mastitis aguda se transforma en subaguda y, a partir de ese momento, habría que tratarla como tal.

## Tratamiento empírico de las mastitis subagudas y subclínicas

En general, los agentes causantes de mastitis subagudas y subclínicas son más resistentes a la antibioterapia pero, afortunadamente, responden bastante bien al tratamiento con probióticos. Los probióticos son microorganismos vivos que ejercen efectos beneficiosos sobre un hospedador y tienen diversas aplicaciones, reales o potenciales, en el binomio madre-hijo<sup>10,11</sup>. Recientemente, dos ensayos clínicos han demostrado que ciertos lactobacilos aislados de leche humana representan una alternativa más eficaz que los antibióticos para el tratamiento de las mastitis<sup>12,13</sup>, y no presentan los efectos secundarios de éstos (candidiasis, trastornos digestivos...).

En general, algunas cepas de *Lactobacillus salivarius* aisladas de leche humana (CECT5713 o PS2) parecen ser las mejores candidatas para el tratamiento de las mastitis subagudas<sup>12,13</sup>, ya que son eficaces en más de un 90% de los casos (tabla 1). Los efectos probióticos dependen de cada cepa, las condiciones de empleo y su posología. En el caso de las cepas de *L. salivarius* citadas anteriormente, la dosis recomendable con fines terapéuticos sería de  $1 \times 10^9$  ufc, 3 veces al día, durante 2-3 semanas, mientras que se podría tomar una dosis diaria de  $1 \times 10^9$  ufc con fines preventivos. La cepa *L. salivarius* PS2 se comercializará en un futuro próximo para dicha indicación. Por otra parte, está prevista la próxima comercialización de otra cepa aislada de leche humana (*L. fermentum* CECT5716<sup>13</sup>, eficaz en un 65-70% de los casos) con el mismo fin. Alternativamente, se puede recurrir a otros productos disponibles en la farmacia que contienen cepas de otras especies de lactobacilos (*L. reuteri*, *L. acidophilus*...). La eficacia de estas cepas suele ser notablemente inferior (<30% de los casos) debido a que están seleccionadas para otro tipo de problemas (gastroenteritis infecciosas pediátricas), que requieren cepas con otras propiedades.

En los casos en que el tratamiento probiótico (primera opción) no curse adecuadamente, se puede optar por un antibiótico (segunda opción). Sin embargo, como se ha comentado, los betalactámicos no suelen ser muy eficaces frente a los agentes etiológicos de este tipo de mastitis. Por tanto, hay que recurrir a otros antibióticos que tradicionalmente no se han tenido en cuenta durante la lactancia, como el ciprofloxacino (tabla 2). La capacidad de este antibiótico para penetrar y difundirse en las biopelículas formadas por *S. epidermidis* es mayor que la de los betalactámicos<sup>14</sup>. Hace años, hubo cierta controversia sobre el uso de las quinolonas en la lactancia debido a los posibles efectos adversos sobre el cartílago articular de los niños; sin embargo, pronto se demostró que el ciprofloxacino no sólo carece de dicho efecto para la especie humana, sino que se trata de uno de los antibióticos más seguros en neonatología<sup>15,16</sup>. En este sentido, actualmente se considera un medicamento de riesgo 0 en la lactancia. Así, el tratamiento de una mujer lactante por vía oral con una dosis de 750 mg/12 h significaría que un niño amamantado recibiría una concentración

máxima de 0,57 mg/kg/día, una dosis muy inferior a la habitual (10-40 mg/kg/día) cuando se tratan directamente los neonatos con el mismo antibiótico<sup>15,17-19</sup>. Además, la pequeña cantidad que llega al niño apenas se absorbe debido a la interferencia causada por el calcio de la propia leche<sup>18</sup>. Finalmente, hay que advertir que los suplementos de hierro (frecuentes durante la lactancia) disminuyen la biodisponibilidad de ciprofloxacino, por lo que reducen su eficacia.

El cotrimoxazol, solo o en combinación, podría ser otra opción, ya que suele ser activo frente a estafilococos (tabla 2). En cambio, otros antibióticos, como la eritromicina o la fosfomicina, suelen ser poco efectivos frente a estos agentes, incluso cuando el resultado del antibiograma indica que son teóricamente sensibles.

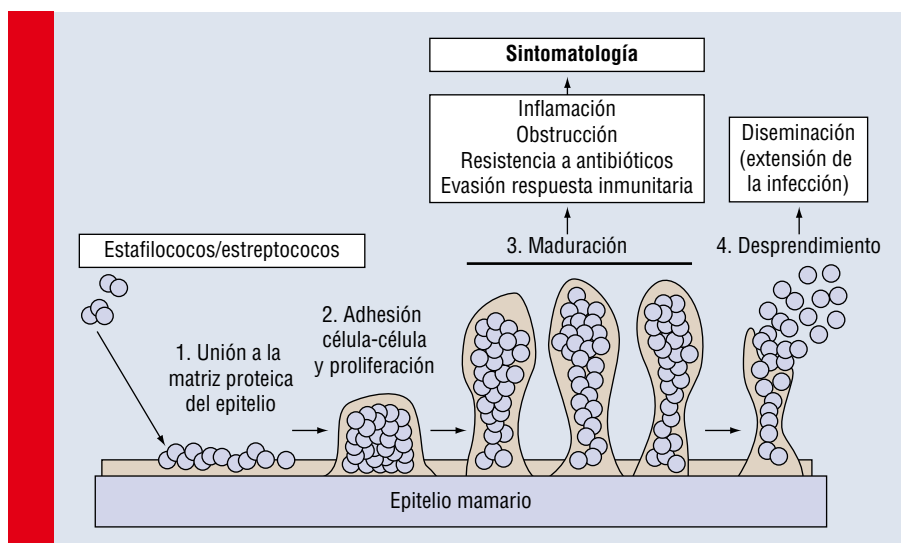
## ¿Por qué los antibióticos fracasan frecuentemente en el tratamiento de las mastitis?

Inicialmente, la penicilina constituyó el tratamiento de elección frente a las infecciones por estafilococos, pero las resistencias se generalizaron rápidamente y el relevo pasó a las penicilinas resistentes a penicilasas de espectro bajo (oxacilina, nafcilina, meticilina, dicloxacilina, cloxacilina), medio (amoxicilina) o, más recientemente, amplio (amoxicilina + ácido clavulánico). Actualmente, el porcentaje de mastitis que se curan con antibioterapia es bajo, una situación que también se observa en medicina veterinaria<sup>20-22</sup>. Este hecho se debe a tres razones fundamentales: a) aumento de cepas resistentes a los antibióticos; b) formación de biopelículas, o biofilms, y c) coexistencia de cepas con distinta sensibilidad a los antibióticos.

Por lo que respecta al primer punto, resulta llamativo que la resistencia a la meticilina y fármacos afines —antibióticos que frecuentemente constituyen la primera elección en las infecciones estafilocócicas— sea del 75-90% entre los aislados hospitalarios de *S. epidermidis* y del 40-60% entre los de *S. aureus*<sup>23</sup>. En algunos países, como Holanda, la implantación de unos programas muy estrictos de higiene ha conseguido reducir notablemente la prevalencia de las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina en los hospitales<sup>24</sup>; sin embargo, estas medidas han sido mucho menos exitosas frente a las cepas de *S. epidermidis* resistentes al mismo fármaco<sup>25</sup>.

La alta resistencia a la meticilina se encuentra codificada en elementos genéticos móviles y, más concretamente, en el *cassette* cromosómico estafilocócico SCCmec. El SCCmec contiene el gen *mecA*, que codifica una proteína de unión a la penicilina (PBP2a), con una afinidad por la meticilina bastante menor que la de otras PBP<sup>26</sup>. Hasta el momento, se han identificado 10 elementos SCCmec diferentes en *S. epidermidis*, y el más abundante es el SCCmec de tipo IV (36%)<sup>27,28</sup>. La presencia de este tipo es relevante ya que, a diferencia de los otros, no implica un coste metabólico para la célula bacteriana que lo





**Figura 3.** Representación esquemática del proceso de formación de una biopelícula o biofilm en el interior de los conductos galactóforos durante una mastitis. (Adaptada de Otto, 2009)<sup>9</sup>

porta y, por tanto, se puede extender en ausencia de la presión selectiva impuesta por la exposición al antibiótico<sup>25</sup>. Por otra parte, existen evidencias que demuestran que tanto los SCC-mec como otros elementos genéticos móviles actualmente extendidos en *S. aureus* fueron originalmente adquiridos a partir de cepas de *S. epidermidis*<sup>24,29</sup>.

En cualquier caso, los genes que confieren resistencia específica frente a antibióticos están ampliamente extendidos en *S. epidermidis*<sup>9</sup>, que constituye un auténtico reservorio para otros estafilococos. Además, las cepas de *S. epidermidis* han adquirido resistencia a muchos otros antibióticos, como gentamicina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, fluoroquinolonas y sulfonamidas<sup>30</sup>. A pesar de ello, el 80% de las infecciones asociadas a catéteres pueden tratarse con otros antibióticos, como la vancomicina, sin necesidad de retirar el catéter<sup>31</sup>. Éste podría ser el caso de las mastitis, ya que la glándula mamaria durante la lactancia realmente se podría equiparar a un complejo «sistema de catéteres»; sin embargo, la vancomicina es uno de los últimos antibióticos eficaces frente a estafilococos multirresistentes, y su uso es exclusivamente hospitalario.

Tampoco se puede asegurar la eficacia de la antibioterapia cuando, en un antibiograma, aparecen una serie de antibióticos a los que, en teoría, es sensible el agente causal. Las pruebas de resistencia a antibióticos se realizan en condiciones que poco tienen que ver con las que se encuentran en una mastitis, infección que suele caracterizarse por la formación de densas biopelículas en los conductos galactóforos. Las biopelículas son aglomeraciones de microorganismos firmemente adheridos a una superficie, con una fisiología y una arquitectura muy características, que forman la base de la gran resistencia que presentan a muchos antibióticos y a los mecanismos de defensa del hospedador<sup>32</sup>. El proceso de formación de biopelículas empieza con la adhesión inicial de las células bacterianas a una superficie y su subsiguiente agregación en estructuras multicelulares (figura 3). Por consiguiente, su desarrollo re-

quiere fuerzas adhesivas, tanto para la colonización de la superficie como para el establecimiento de interacciones célula-célula. Paralelamente, se necesitan fuerzas disruptivas para la formación de los canales que suministrarán los nutrientes a todas las células de la biopelícula; ambas fuerzas son responsables de la típica estructura tridimensional de una biopelícula madura. Las fuerzas disruptivas también están implicadas en el desprendimiento de ciertos grupos de células de la biopelícula, lo que puede conducir a una diseminación de la infección<sup>33</sup>.

Los genomas de los estafilococos en general, y de *S. epidermidis* en particular, muestran una sustancial adaptación al modo de crecimiento en forma de biopelículas, incluyendo la regulación negativa de procesos celulares básicos, como la biosíntesis de ácidos nucleicos, de proteínas y de la pared celular<sup>34</sup>. Estos cambios en la regulación génica explican por qué la actividad de muchos antibióticos cuya diana son las células bacterianas que crecen activamente (p. ej., penicilinas o aminoglucósidos) es muy limitada frente a las biopelículas de *S. epidermidis*<sup>35,36</sup>. Además, la capacidad de penetración en una biopelícula varía en función del antibiótico; así, recientemente se ha observado que la capacidad de oxacilina, cefotaxima y vancomicina para penetrar en biopelículas de *S. aureus* o *S. epidermidis* es muy reducida, en contraste con la de amikacina o ciprofloxacino<sup>14</sup>.

## Antiinflamatorios no esteroideos

Cuando la respuesta inmunitaria frente a un microorganismo es demasiado intensa, la propia reacción del hospedador se convierte en corresponsable de la patología y la sintomatología. En tales casos, el problema suele radicar en una inflamación perjudicial para el órgano afectado, independientemente de que el microorganismo haya podido ser controlado o no<sup>37</sup>. Entre los ejemplos de este fenómeno se incluyen enfermedades estafilocócicas, como el síndrome de *shock* tóxico, cuya

patogenia se basa en la excesiva activación de la respuesta inmunitaria frente a una toxina estafilocócica. La situación es similar en las mastitis agudas causadas por *S. aureus* y también, en menor medida, en las subagudas. En estas infecciones, la terapia antimicrobiana, por sí sola, fracasa frecuentemente porque no reduce la respuesta inflamatoria. De hecho, las nuevas direcciones en el tratamiento de enfermedades infecciosas que se caracterizan por una intensa inflamación implican el empleo de tratamientos antiinflamatorios complementarios a los antiinfecciosos<sup>38</sup>.

Por tanto, la resolución de las mastitis de cualquier tipo en un tiempo prudencial requiere que el tratamiento antibiótico se asocie con un antiinflamatorio no esteroideo. En las mastitis agudas con fiebre elevada es recomendable alternar paracetamol (650 mg o 1 g) e ibuprofeno (600 mg). Ambos fármacos son de riesgo 0 en la lactancia y se pueden administrar cada 6 horas (tabla 2). En procesos sin fiebre, o si ésta ya ha desaparecido, habría que optar únicamente por la administración de ibuprofeno, ya que su potencial antiinflamatorio es superior al de paracetamol. En cualquier caso, habría que evitar el empleo de corticoides ya que, aunque pueden aliviar momentáneamente la sintomatología, también pueden favorecer una progresión de la infección.

### Prácticas comunes pero no recomendables

Existen, al menos, tres prácticas comunes durante las mastitis que pueden contribuir a que el problema se prolongue. Las dos primeras consisten en extenderse unas gotas de la propia leche y/o aplicar lanolina en el pezón y la areola mamaria después de la tomas. No hay problema para hacerlo mientras no haya síntomas de mastitis pero, ante su presencia, es preferible evitarlas ya que, en un caso, se favorece la propagación de las bacterias causantes del problema y, en el otro, se crea un ambiente propicio para su crecimiento. En tales situaciones, sería mejor aplicar (si existe sequedad en el pezón y/o la areola mamaria) una capa de aceite de oliva, que no favorece el crecimiento bacteriano y cuyo componente principal (el ácido oleico) tiene propiedades antiinflamatorias.

La tercera práctica es la aplicación de calor local. Cuando las bacterias crecen por encima de los límites fisiológicos, las biopelículas que forman inflaman y obstruyen los conductos galactóforos, provocando una retención de leche. A medida que aumenta la retención, la secreción de leche se dificulta y las tomas pueden llegar a ser muy largas y desagradables para la madre. En tales circunstancias, la aplicación de calor puede aliviar momentáneamente el cuadro, ya que dilata los conductos y, por tanto, la leche sale con menos dificultad. Al mismo tiempo, la temperatura del pecho aumenta, creándose condiciones óptimas para la multiplicación de las bacterias que están causando la mastitis. En conclusión, el calor proporciona un alivio pasajero pero el cuadro se puede prolongar, por lo que sería deseable evitarlo. No obstante, en los casos de mujeres

con una retención tan importante que únicamente sientan alivio con la aplicación de calor, éste debería aplicarse inmediatamente (3-5 min) antes de la toma, y seguidamente frío local (5-10 min).

### Agradecimientos

Esta línea de trabajo está financiada mediante los proyectos CSD2007-00063 (FUN-C-FOOD, Consolider-Ingenio 2010) y AGL2010-15420 del Ministerio de Ciencia e Innovación. ■

### Bibliografía

- Rodríguez JM, Jiménez E, Merino V, Maldonado ML, Marín ML, Fernández L, et al. Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. *Acta Pediatr Esp*. 2008; 66: 77-82.
- Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (I). *Acta Pediatr Esp*. 2009; 67: 77-84.
- Jiménez E, Delgado S, Arroyo R, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (II). *Acta Pediatr Esp*. 2009; 67: 125-132.
- Arroyo R, Mediano P, Jiménez E, Delgado S, Fernández L, Marín M, et al. Diagnóstico etiológico de las mastitis infecciosas: propuesta de protocolo para el cultivo de muestras de leche humana. *Acta Pediatr Esp*. 2011; 69: 276-281.
- Moazzez A, Kelso RL, Towfigh S, Sohn H, Berne TV, Mason RJ. Breast abscess bacteriologic features in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemics. *Arch Surg*. 2007; 142: 881-884.
- Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Herrero E, Del Campo R, Marín M, et al. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiol*. 2009; 9: 82.
- Pavioir S, Musaad S, Roberts S, Taylor G, Taylor S, Shore K, et al. *Corynebacterium* species isolated from patients with mastitis. *Clin Infect Dis*. 2002; 35: 1.434-1.440.
- Bercot B, Kannengiesser C, Oudin C, Grandchamp B, Sanson-le Pors MJ, et al. First description of NOD2 variant associated with defective neutrophil responses in a woman with granulomatous mastitis related to *corynebacteria*. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 3.034-3.037.
- Otto M. *Staphylococcus epidermidis*: the «accidental» pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7: 555-567.
- Rodríguez JM, Dalmau J. Probióticos para el binomio madre-hijo (I). *Acta Pediatr Esp*. 2007; 65: 452-457.
- Rodríguez JM, Dalmau J. Probióticos para el binomio madre-hijo (II). *Acta Pediatr Esp*. 2007; 65: 513-518.
- Jiménez E, Fernández L, Maldonado A, Martín R, Olivares M, Xaus J, et al. Oral administration of lactobacilli strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74: 4.650-4.655.
- Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis*. 2010; 50: 1.551-1.558.
- Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 1.955-1.958.

15. Gürpınar AN, Balkan E, Kiliç N, Kiriştiöğlu I, Doğruyol H. The effects of a fluoroquinolone on the growth and development of infants. *J Int Med Res.* 1997; 25: 302-306.
16. Dutta S, Chowdhary G, Kumar P, Mukhopadhyay K, Narang A. Ciprofloxacin administration to very low birth weight babies has no effect on linear growth in infancy. *J Trop Pediatr.* 2006; 52: 103-106.
17. Van den Oever HL, Versteegh FG, Thewissen EA, Van den Anker JN, Mouton JW, Neijens HJ. Ciprofloxacin in preterm neonates: case report and review of the literature. *Eur J Pediatr.* 1998; 157: 843-845.
18. Belet N, Hacımeroglu P, Kucukoduk S. Ciprofloxacin treatment in newborns with multi-drug-resistant nosocomial *Pseudomonas* infections. *Biol Neonate.* 2004; 85: 263-268.
19. Drossou-Agakidou V, Roilides E, Papakyriakidou-Koliouska P, Agakidis C, Nikolaides N, Sarafidis K, et al. Use of ciprofloxacin in neonatal sepsis: lack of adverse effects up to one year. *Pediatr Infect Dis J.* 2004; 23: 346-349.
20. Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Menard C, Roy PH, Ouellette M, et al. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 231-238.
21. Rich M, Deighton L, Roberts L. Clindamycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Vet Microbiol.* 2005; 111: 237-240.
22. Luthje P, Schwarz S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57: 966-969.
23. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. SENTRY Participants Group. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001; 32 Supl 2: 114-132.
24. Vos MC, Ott A, Verbrugh HA. Successful search-and-destroy policy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in The Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 2034.
25. Van Pelt C, Nouwen J, Lugtenburg E, Van der Schee C, De Marie S, Schuijff P, et al. Strict infection control measures do not prevent clonal spread of coagulase negative staphylococci colonizing central venous catheters in neutropenic hemato-oncologic patients. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003; 38: 153-158.
26. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2001; 9(10): 486-493.
27. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, et al. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 1.147-1.152.
28. Miragaia M, Couto I, De Lencastre H. Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *Microb Drug Resist.* 2005; 11: 83-93.
29. Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase negative staphylococci. *N Engl J Med.* 1987; 316: 927-931.
30. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infect Dis Clin North Am.* 2009; 23: 73-98.
31. Raad I, Hanna H, Maki D. Intravascular catheter related infections: advances in diagnosis, prevention, and management. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7: 645-657.
32. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284: 1.318-1.322.
33. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R, Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Sci Annu Rev Microbiol.* 2000; 54: 49-79.
34. Yao Y, Sturdevant DE, Otto M. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol soluble modulins in formation of biofilms. *J Infect Dis.* 2005; 191: 289-298.
35. Khardori N, Yassien M, Wilson K. Tolerance of *Staphylococcus epidermidis* grown from indwelling vascular catheters to antimicrobial agents. *J Ind Microbiol.* 1995; 15: 148-151.
36. Duguid IG, Evans E, Brown MR, Gilbert P. Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *J Antimicrobiol Chemother.* 1992; 30: 803-810.
37. Casadevall A, Pirofski LA. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2003; 1: 17-24.
38. Pirofski LA, Casadevall A. What is a pathogen? A question that begs the point. *BMC Biol.* 2012; 10: 6.





## *X. Apéndices*

---

### *Apéndice X.3*

*Cuestionario epidemiológico del estudio sobre  
los factores de riesgo de la mastitis infecciosa  
durante la lactancia*





## HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

### CUESTIONARIO PARA MUJERES LACTANTES

#### INSTRUCCIONES

- Este cuestionario está diseñado para investigar los factores relacionados con la aparición la mastitis y **pueden rellenarlo tanto mujeres afectadas con mastitis como mujeres sin síntomas**
- Por favor, lea atentamente las preguntas y responda a todas las que pueda aunque la respuesta sea negativa. Para responder tiene que señalar con una X o subrayar la respuesta adecuada, elegir entre SI o NO o valorar de 1-5. Algunas cuestiones requieren escribir una respuesta breve.

#### PERSONA QUE RECOGE LA INFORMACIÓN

- Nombre/Apellidos:
- Profesión:
- Centro de Salud, Grupo de Apoyo a la Lactancia, etc.:
- Ciudad y provincia:
- Teléfonos:
- Correo electrónico:

#### DATOS MUJER LACTANTE

- Nombre/Apellidos paciente:
- Fecha de nacimiento:
- Edad en el momento del último parto:
- Dirección, ciudad y provincia:
- Teléfonos:
- Correo electrónico:
- Profesión:

#### SECCIÓN (I): FICHA MÉDICA DE LA PACIENTE

- Marque con una X su **Grupo Sanguíneo y Rh**

Grupo Sanguíneo					Rh		
A	B	AB	O	No sabe	Pos +	Neg -	No sabe

- **Altura y peso:**

- **¿Tiene más hijos?**    **NO**                      **SI**, especifique su/s edad/es:

**IMPORTANTE:** las siguientes preguntas se refieren solamente a enfermedades o afecciones que padeció durante los 6 MESES ANTERIORES AL EMBARAZO

- ¿Ha padecido alguna de estas **enfermedades o afecciones**? Marque con una X donde corresponda:

Aparato	Enfermedad	SI	NO	NO SABE
<b>Aparato Digestivo</b>	Gastroenteritis			
	Gastritis			
	Enfermedad de Crohn			
	Colitis ulcerosa			
	Colon irritable			
	Otros (especifique):			
<b>Tracto urinario</b>	Cistitis			
	Otros (especifique)			
<b>Aparato genital</b>	Candidiasis			
	Vaginosis bacteriana			
	Inflamación glándulas Bartolino			
<b>Otras (especificar):</b>				

Lugar	Enfermedad/Afecciones	SI	NO	NO SABE
<b>Ojos</b>	Conjuntivitis			
	Orzuelos			
<b>Oídos</b>	Otitis			
<b>Garganta</b>	Faringitis			
	Laringitis			
<b>Nariz o labios</b>	Forúnculos			
	Herpes			
<b>Piel</b>	Psoriasis			
	Dermatitis			
	Eczema atópico			
	Impétigo			
	Abscesos			
<b>Otras (especificar):</b>				

**Otros problemas.** Marque con una X donde corresponda y por favor especifique en caso necesario de que problema se trata:

	SI	NO	NO SABE
<b>Alergias o intolerancias.</b> Especifique:			
<b>Alergias a antibióticos.</b> Especifique:			
<b>Enfermedades de tipo autoinmune.</b> Especifique:			
<b>Asma</b>			
<b>Enfermedades cardiovasculares.</b> Especifique:			
<b>Anemia.</b> Tipo:			
<b>Diabetes.</b> Tipo:			
<b>Enfermedades tiroideas.</b> Especifique:			
<b>Síndrome de Raynaud</b> (trastorno que afecta a la circulación de la sangre) ¿En los dedos? SI NO ¿En los pezones? SI NO ¿Algún antecedente familiar? SI NO			

- ¿Tiene algún **antecedente familiar** de **cáncer de mamá**?

Especifique <b>quién</b> :	SI	NO	NO SABE
----------------------------	----	----	---------

- ¿Se ha sometido a **cirugía mamaria**? En caso afirmativo cuál:

Cirugía mamaria (reducción, implante, tumor mamario, etc.)	SI	NO
--	----	----

- **Antecedentes familiares de mastitis.** ¿Su madre, abuelas (materna o paterna), tías o hermanas han tenido problemas de mastitis al tener a sus hijos? **SI**  
**NO** En caso afirmativo especifique quiénes:

- **Mastitis recurrente.** ¿Ha tenido **mastitis en lactancias anteriores**? **SI**  
**NO** En caso afirmativo especifique si aparecieron en todas:

- **Si hubo mastitis en lactancias anteriores,** especifique si los síntomas fueron:

Similares al episodio actual	
Peores que en el episodio actual (eran grietas más grandes, más fiebre, pecho más hinchado, etc.)	
Más benignos que en el episodio actual (grietas más pequeñas, menos fiebre, menos hinchazón, etc.)	

- **Hábitos tóxicos:**

		6 meses antes de embarazo	En el embarazo	Después del parto
<b>¿Fuma?</b>	NO			
	SI			
<b>¿Alcohol?</b>	NO			
	SI			

**SECCIÓN (II): EMBARAZO, PARTO Y POSPARTO**

Esta sección se refiere a su **último hijo**

- Señale si ha tenido **incidencias** durante el embarazo **NO SI**, especifique:

- ¿Ha tenido **amenaza de aborto**?

- **Medicación durante el embarazo** (especial énfasis en el uso de antibióticos)

	No	No recuerda	SI (especificar tratamiento y trimestre embarazo)
<b>Antibióticos</b>			
<b>Antifúngicos</b>			
<b>Analgésicos</b>			
<b>Otros</b>			

- Si ha tenido alguno de estos **síntomas en pecho/pezones** antes de dar a luz, marque una X en la casilla adecuada:

	Pecho Derecho	Pecho Izquierdo	Pezón D	Pezón I
Picores				
Descamación				
Molestias				
Otros				

- Resultado del examen del exudado vaginal para **estreptococos grupo B** en semana 35-37:

Negativo	
Positivo	

- **Lugar del parto:**

Hospital Público	
Clínica Privada	
En casa	

- **Tipo de parto:**

Vaginal sin instrumentos	
Vaginal con instrumentos	
Cesárea	
Con episiotomía	

- **Anestesia durante el parto:** SI: epidural, total **NO**

- **Antibioterapia durante el parto:** SI **NO**

- **Fecha del parto:** **Peso/talla del hijo al nacer:**
- **Edad del hijo** (en el momento de rellenar la encuesta):
- **Grupo sanguíneo del bebé:** **Sexo del bebé:**
- Resultado del **Test APGAR** (valoración del estado del neonato tras el parto, de 1-10):

9 o 10	
Menos de 9	

- ¿El bebé ha presentado alguna de las siguientes **enfermedades o anomalías**?

		SI	NO	NO SABE
1	Hipoglucemia			
2	Leve ictericia			
3	Ictericia grave			
4	Deshidratación			
5	Eczema			
6	Micrognatia (mandíbula pequeña)			
7	Candidiasis oral (muguet)			
8	Frenillo labial			
9	Frenillo sublingual			
10	Otros			

- ¿Cuándo tuvo **contacto** con el bebé la **primera vez**? (considerar también el contacto piel-piel tras el parto o puesta al pecho)

Inmediatamente	
Después de varios minutos	
Después de varias horas	
Después de varios días	

- ¿Ha habido **separación** en algún momento? **SI** **NO**

Causa	
Duración	

- En el hospital el bebé estuvo:

1	Junto a usted en la cama	
2	Junto a usted en la cuna	
3	En el nido	
4	En la incubadora	
5	Otros	

- **Número de días** que estuvieron en el **hospital**:

Especifique si el bebé se quedó ingresado durante más tiempo: **NO** **SI**, en caso afirmativo diga la **causa** y el **número de días**:



**SECCIÓN (III): LACTANCIA**

- ¿Cuánto tardó **la leche en subir**?

Horas	
Un día	
Varios días	

- ¿Cuándo le puso al **pecho por primera vez**?

Inmediatamente	
Después de varias horas	
Al día siguiente	

- ¿Tuvo el bebé algún **problema para agarrarse** la primera vez? **SI NO**  
 ¿Y después? **SI NO** ¿Sabe si hubo alguna causa?

- Respecto a la **cantidad de leche**, señale si cree que tiene:

Abundancia de leche	
Cantidad normal	
Poca leche	

- **Tipo de lactancia:**

1	Lactancia materna exclusiva	
2	Lactancia mixta (pecho + biberones fórmula)	
3	Biberones de leche materna	
4	Biberones de leche fórmula	

- ¿Su bebé tiene **preferencia por algún pecho** para mamar?

Pecho izquierdo	
Pecho derecho	
No tiene preferencia	

- ¿El bebé empieza a mamar siempre por el mismo pecho? **SI NO**  
 ¿Por cuál? **IZQ DCHO**

- ¿El bebe mama de los dos pechos en cada toma o de uno cada vez?  
**De los dos De uno**

- ¿Después de amamantar, el pecho se queda vacío de leche? **SI NO NO siempre**

- ¿Hay alguna **interferencia a la succión**?

		Si	No
1	Chupete		
2	Pezoneras		
3	Tetinas (biberones de leche materna)		
4	Tetinas (biberones de leche de fórmula)		

5	Pezones planos o invertidos		
6	Piercing en pezón		

- Señale si utiliza:

	No	Si	¿Cuáles?
Cremas, lociones o aceites para los pezones			
Bomba manual para extraer la leche			
Bomba mecánica para extraer la leche			
Discos de lactancia			

- Si utiliza **bombas** manuales o mecánicas:

¿Limpia y desinfecta las bombas? **SI** **NO** ¿Cómo? ¿Con qué frecuencia?

¿Esteriliza las bombas? **SI** **NO** ¿Cómo? ¿Con qué frecuencia?

- Si su hijo nació con **frenillo**, ¿qué tipo de frenillo le han diagnosticado?

1	Severo	
2	Moderado	
3	Leve	
4	Submucoso	

¿Le han **operado** ya? **SI** **NO**

¿Ha notado **mejoría** respecto a la lactancia después de la operación? **SI** **NO**

- **Posiciones para amamantar:** Marque todas aquellas que utilice

1	Posición de cuna	
2	Posición tumbada	
3	Otras	

- **Horarios de lactancia:** especificar si la lactancia es a demanda o con tomas establecidas a lo largo del día y la noche

	Duración toma (min)	
Lactancia a demanda		
Durante el día las tomas son cada .....horas		
Durante la noche tomas son cada .....horas		
¿El bebé se salta tomas con frecuencia?	<b>SI</b>	<b>NO</b>

- ¿Sigue **lactando actualmente**? **SI** **NO**, motivo:

- ¿Da de mamar a más de un hijo? **SI** (gemelos, tándem) **NO**

- **Lavado de manos/pezones.** Señale:

	SI	NO
¿Se lava los pezones antes de la toma?		
¿Se lava los pezones después de la toma?		
¿Se lava las manos antes de la toma?		

- ¿Ha tomado alguna **MEDICACIÓN DURANTE LA LACTANCIA** por **motivos NO relacionados con problemas en el pecho?**

	NO	NO SABE	Especificar motivo/medicamento:
Antibióticos			
Antifúngicos			
Analgésicos			
Antiinflamatorios no esteroideos			
Corticosteroides			
Otros			

- ¿Tiene **dolor/molestias en el pezón?** ..... SI NO

- ¿Tiene **grietas en el pezón?** ..... SI NO

Valore las grietas en el pezón de **1 (no tiene)** a **5 (grietas profundas)**:

- ¿Tiene **dolor/molestias en el pecho?** .....SI NO

- ¿Tiene el **pecho enrojecido y/o hinchado?** .....SI NO

- ¿Tiene **fiebre o escalofríos?** .....SI NO

- ¿Cree que su **cantidad de leche** ha disminuido? .....SI NO

- ¿Ha sido diagnosticada de **mastitis en la lactancia actual?** .....SI NO

- ¿Ha tomado alguna **MEDICACIÓN DURANTE LA LACTANCIA** para alguno de los síntomas anteriores?

	NO	SI. Especificar medicamento:
Antibióticos orales		
Antibióticos tópicos		
Antifúngicos orales		
Antifúngicos tópicos		
Analgésicos		
Antiinflamatorios no esteroideos		
Corticosteroides		
Otros		

#### **Sugerencia de cita de este cuestionario:**

Mediano P, Fernández L, Rodríguez JM, Marín M (2009). *Cuestionario epidemiológico para el estudio sobre factores de riesgo de la mastitis infecciosa en mujeres lactantes*. Grupo de Investigación PROBILAC. Universidad Complutense de Madrid.

## *X. Apéndices*

---

### *Apéndice X.4*

*Listado de figuras*

*Listado de tablas*

*Listado de abreviaturas*



## LISTADO DE FIGURAS

**Figura 1.** Anatomía clásica de la glándula mamaria

**Figura 2.** Anatomía revisada de la glándula mamaria

**Figura 3.** Estructura de la unidad ductolobular terminal

**Figura 4.** Principales tipos celulares presentes en la glándula mamaria

**Figura 5.** Estructura lobular de la glándula mamaria

**Figura 6.** Desarrollo embrionario de la glándula mamaria

**Figura 7.** Desarrollo esquemático posnatal de la glándula mamaria

**Figura 8.** Perfil hormonal durante la pubertad, los ciclos estrales y la gestación

**Figura 9.** Cambios histológicos en la glándula mamaria

**Figura 10.** Representación de las cinco vías de transporte de los componentes de la leche a través del epitelio secretor de la glándula mamaria

**Figura 11.** Control neuroendocrino del reflejo de eyección de leche

**Figura 12.** Signos externos (arriba) y lo que ocurre dentro de la boca del lactante (abajo) cuando se produce un buen y mal agarre al pecho

**Figura 13.** Tendencia de la tasa de lactancia materna exclusiva entre los años 1996 y 2006

**Figura 14.** Transferencia de inmunidad de la madre al lactante

**Figura 15.** Posibles rutas para el establecimiento de la microbiota de la leche materna

**Figura 16.** Tipos de mastitis y principales microorganismos implicados. **16A.** Mastitis aguda. **16B.** *S. aureus*. **16C.** Mastitis subaguda. **16D.** *S. epidermidis*. **16E.** *St. salivarius*. **16F.** Mastitis granulomatosa. **16G.** Corinebacterias en el interior de un lipogranuloma.

**Figura 17.** Representación esquemática de la etiopatogenia de las mastitis humanas.

**Figura 18.** Esquema de los pasos a seguir para la recolección y conservación de muestras de leche destinadas a un análisis microbiológico

**Figura 19.** Representación esquemática del proceso de formación de un *biofilm* en el interior de los conductos galactóforos durante una mastitis

**Figura 20.** Riesgo de infección intramamaria durante la lactancia en función de la capacidad de reclutamiento de neutrófilos de la glándula mamaria

## **LISTADO DE TABLAS**

**Tabla 1.** Composición bioquímica y energía del calostro y la leche madura

**Tabla 2.** Composición en vitaminas y minerales del calostro y la leche madura

**Tabla 3.** Actividad biológica de los principales componentes de la leche humana

**Tabla 4.** Principales factores que contribuyen a las bajas tasas de lactancia materna exclusiva a nivel mundial

**Tabla 5.** Resultados de la Encuesta Nacional de Salud para la lactancia materna

**Tabla 6.** Tasas de lactancia materna exclusiva a los 6 meses en función de los ingresos familiares a nivel mundial

**Tabla 7.** Ventajas asociadas a la lactancia materna

**Tabla 8.** Principales factores de la leche materna implicados en la protección frente a infecciones

**Tabla 9.** Principales géneros de bacterias detectados en la leche materna mediante técnicas independientes de cultivo

**Tabla 10.** Tipos de mastitis, agentes etiológicos y sintomatología más representativa

**Tabla 11.** Propuesta de tratamiento para los distintos tipos de mastitis

**Tabla 12.** Nivel de riesgo y parámetros cinéticos de diversos medicamentos empleados en el tratamiento de las mastitis

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>16S rRNA</b>	<b>16S Ribosomal Ribonucleic Acid</b> (ácido ribonucleico ribosómico 16S)
<b>AA</b>	Ácido araquidónico
<b>AAP</b>	<i>American Academy of Pediatrics</i>
<b>AEP</b>	Asociación Española de Pediatría
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>CAMP</b>	<i>Christie, Atkins, and Munch-Peterson</i> (prueba de)
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i> (grupo de diferenciación, molécula de la superficie celular que identifica a una estirpe celular o un estadio de diferenciación; tipo de antígeno propio del sistema inmune de mamíferos)
<b>CDs</b>	Células dendríticas
<b>CECT</b>	Colección Española de Cultivos Tipo
<b>CHAI</b>	<i>Chi-square automatic interaction detection</i>
<b>CLM</b>	Comité de Lactancia Materna
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
<b>Curva ROC</b>	<i>Receiver Operating Characteristic curve</i>
<b>DC-SIGN</b>	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i> (receptor presente en la superficie de las células dendríticas)
<b>DHA</b>	<i>Docosahexanoic acid</i> (ácido docosahexanoico)
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
<b>ECN</b>	Estafilococos coagulasa-negativos
<b>EGB</b>	Estreptococo del grupo B ( <i>Streptococcus agalactiae</i> )
<b>EGV</b>	Estreptococos del grupo viridans
<b>EUCAST</b>	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<b>GALT</b>	<i>Gastrointestinal tract-Associated Lymphoid Tissue</i> (tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal)
<b>HAMLET</b>	<i>Human Alpha-lactalbumin Made LEthal to Tumor cells</i> ( $\alpha$ -lactoalbúmina transformada en letal para las células tumorales)
<b>HLA</b>	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (antígenos leucocitarios humanos)
<b>HMOs</b>	<i>Human Milk Oligosaccharides</i> (oligosacáridos de leche materna)
<b>HTLV</b>	<i>Human T-Lymphotropic Virus</i> (virus linfotróficos de células T humanas)
<b>IGF</b>	<i>Insulin growth factor</i> (factor de crecimiento insulínico)
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IgAs</b>	Inmunoglobulina A secretora
<b>IHAN</b>	Iniciativa para la Humanización de la Asistencia al Nacimiento y la Lactancia
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>LT</b>	Linfocitos T
<b>MALDI-TOF</b>	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i> (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz con detección de tiempo de vuelo)
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (complejo mayor de histocompatibilidad)



<b>Mφ</b>	<b>Macrófagos</b>
<b>mRNA</b>	<b>Messenger Ribonucleic Acid</b> (ácido ribonucleico mensajero)
<b>MUC</b>	<b>Mucina</b> (glicoproteína producida por tejidos epiteliales)
<b>NCBI</b>	<b>National Center for Biotechnology Information</b>
<b>NEC</b>	<b>Necrotizing Enterocolitis</b> (enterocolitis necrotizante)
<b>OMS</b>	<b>Organización Mundial de la Salud</b>
<b>ONPG</b>	<b>orto-Nitrophenyl-β-galactoside</b> (orto-nitrofenil galactopiranosido)
<b>OD</b>	<b>Odds ratio</b>
<b>PD-L1</b>	<b>Programmed death-ligand 1</b> (ligando de la molécula de muerte programada 1 o CD274)
<b>PFGE</b>	<b>Pulsed Field Gel Electrophoresis</b> (electroforesis en campo pulsado)
<b>PMN</b>	<b>Polimorfonucleados</b>
<b>PNC</b>	<b>Platelet-Neutrophil Complex</b> (complejos plaqueta-neutrófilo)
<b>PCR</b>	<b>Polimerase chain reaction</b> (reacción en cadena de la polimerasa)
<b>RALT</b>	<b>Respiratory tract-Associated Lymphoid Tissue</b> (tejido linfoide asociado al tracto respiratorio)
<b>RCS</b>	<b>Recuento de células somáticas</b>
<b>ROS</b>	<b>Reactive Oxygen Species</b> (especies de oxígeno reactivo)
<b>SCCmec</b>	<b>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</b> (locus de resistencia a la meticilina)
<b>SAgS</b>	<b>Superantígenos</b>
<b>SEGO</b>	<b>Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología</b>
<b>SEIMC</b>	<b>Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica</b>
<b>SEMFYC</b>	<b>Sociedad Española de Medicina Familiar y Comunitaria</b>
<b>SEN</b>	<b>Sociedad Española de Neonatología</b>
<b>SEQ</b>	<b>Sociedad Española de Quimioterapia</b>
<b>SNP</b>	<b>Single Nucleotide Polymorphism</b> (polimorfismo de un solo nucleótido)
<b>SR</b>	<b>Síndrome de Raynaud</b>
<b>TGB-β</b>	<b>Transforming Growth Factor β</b> (factor de crecimiento transformante beta)
<b>TLR</b>	<b>Toll-Like Receptors</b> (receptores de tipo Toll)
<b>UFC</b>	<b>Unidades formadoras de colonias</b>
<b>UNICEF</b>	<b>United Nations International Children's Emergency Fund</b> (Fondo Internacional de Emergencia de las Naciones Unidas para la Infancia)
<b>VIH</b>	<b>Virus de la inmunodeficiencia humana</b>
<b>WHO</b>	<b>World Health Organization</b> (Organización Mundial de la Salud)



